

# Entwicklung und Validierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) für die Quantifizierung von Carbamazepin in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Chemie  
eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

Dipl. Chem. Arnold Bahlmann

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Ulrich Panne
2. Dr. Rudolf J. Schneider
3. Dr. Michael G. Weller

Tag der mündlichen Prüfung: 5. September 2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2007 bis September 2010 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ulrich Panne, Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin, durchgeführt.

## Kurzzusammenfassung

Ein kompetitiver ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) für den Nachweis von Carbamazepin (CBZ) mit einer Bestimmungsgrenze von ca. 30 ng/L wurde entwickelt und validiert. Dieser in Gewässern häufig auftretende anthropogene Marker wurde anschließend in einer Vielzahl an Proben aus Abwässern, Oberflächengewässern und Trinkwässern nachgewiesen. Der ELISA zeigte eine exzellente Präzision und erbrachte in allen Matrices geringfügig höhere Analysenergebnisse als die Referenzmethode HPLC-MS/MS. Die beständige Überbestimmung der CBZ-Konzentration in Höhe von ca. 7 % konnte auf die Präsenz von Cetirizin und geringen Mengen des persistenten Metaboliten 10,11-Epoxy-carbamazepin (EP-CBZ) zurückgeführt werden.

Die Bindungseigenschaften des verwendeten Antikörpers wurden anhand der Kreuzreaktivitäten von 37 Substanzen eingehend untersucht. Nach Kopplung von Flüssigchromatographie und ELISA konnte das strukturell nicht mit CBZ verwandte Antihistaminikum Cetirizin als Kreuzreaktand identifiziert werden. Der störende Einfluss dieses Kreuzreaktanden auf den CBZ-ELISA konnte nach einer Änderung des pH-Wertes im Probenpuffer minimiert werden. Die pH-abhängige Selektivitätssteuerung ermöglichte überdies die Entwicklung eines Dual-Analyt-Immunoassays für die parallele Bestimmung von CBZ und Cetirizin.

Darüber hinaus wurden die Metaboliten EP-CBZ, DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ und 10-OH-CBZ in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser quantifiziert. DiOH-CBZ erwies sich als ähnlich persistent wie CBZ und wurde in besonders hohen Konzentrationen gefunden. Außerdem wurden mehrere weitere bislang nicht identifizierte Abbauprodukte von CBZ gefunden.

Mit dem ELISA konnten tagesabhängige und saisonale Schwankungen der Arzneimittelkonzentrationen in Abwasser und in Oberflächengewässern nachgewiesen werden. Der anthropogene Marker CBZ ermöglichte es, den Weg des Abwassers in die aufnehmenden Gewässer zu verfolgen.

Da weder Probenvorbereitung noch Probenanreicherung erforderlich sind, ist der Test schnell und kostengünstig durchführbar. Die für den Test nötigen Probenvolumen sind mit weniger als 1 mL sehr gering. Diese Eigenschaften erlauben ein Hochdurchsatzscreening und machen die Methode interessant für den Einsatz im Gewässermonitoring.



## Abstract

A competitive ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) for the quantitation of carbamazepine (CBZ) was developed and validated. A limit of quantitation (LOQ) of ca. 30 ng/L allowed for the quantitation of CBZ in many samples from wastewater, surface water and drinking water. The method was found to be excellently precise, but it displayed slightly higher results than obtained by the reference method liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The nearly constant overestimation of 7 % could be attributed to the presence of small amounts of cetirizine and the persistent metabolite 10,11-epoxycarbamazepine (EP-CBZ).

The binding properties of the antibody were studied by determining the cross-reactivities of 37 compounds. Hyphenating liquid chromatography to ELISA led to the discovery of the cross-reactive antihistamine cetirizine that shares no obvious structural similarity with CBZ. The bias caused by cetirizine was eliminated by changing the pH value of the sample buffer. Moreover, the antibody's pH-dependent selectivity enabled a dual-analyte immunoassay for the parallel determination of CBZ and cetirizine.

Furthermore, the metabolites EP-CBZ, DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ and 10-OH-CBZ were quantified in wastewater, surface water and drinking water. DiOH-CBZ showed the highest concentrations of all analytes investigated and was found to be equally persistent as CBZ. In addition, several further degradation products of CBZ were found that could not be identified.

The ELISA allowed the detection of diurnal and seasonal fluctuations of analyte concentrations in wastewater and surface water. The anthropogenic marker CBZ enabled to trace wastewater from the source to the receiving waters. Since neither sample pretreatment nor enrichment is necessary, the method is very fast and cost-effective. Only a small sample volume (less than 1 mL) is needed making this ELISA an appropriate high-throughput screening tool for environmental monitoring.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Ziele der Arbeit .....	3
<b>2</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>4</b>
2.1	Der anthropogene Marker Carbamazepin (CBZ) .....	4
2.1.1	Therapeutische Verwendung .....	4
2.1.2	Struktur .....	5
2.1.3	Metabolismus .....	6
2.1.4	Verwendung von anthropogenen Markern .....	9
2.2	Carbamazepin in der Umwelt .....	10
2.2.1	Auftreten in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser .....	10
2.2.2	Situation in Berlin .....	13
2.2.3	Abbau im Klärwerk .....	16
2.2.4	Abbau in der Umwelt .....	19
2.2.5	Aufnahme von CBZ durch Pflanzen und Fische .....	20
2.2.6	Grenzwerte und gesetzliche Regulierungen .....	21
2.3	Stand der Technik: HPLC-MS/MS .....	21
2.4	Immunchemische Methoden .....	22
2.4.1	Kompetitiver ELISA .....	22
2.4.2	Auswertung eines Immunoassays .....	25
2.4.3	Selektivität und Kreuzreaktionen .....	28
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1	Chemikalien .....	31
3.2	Puffer .....	33
3.3	Materialien .....	34
3.4	Geräte .....	35
3.5	Herstellung der Enzymkonjugate .....	35
3.5.1	CBZ-HRP .....	35
3.5.2	CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 1 .....	36
3.5.3	CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 2-4 .....	36
3.5.4	CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 5 .....	38
3.5.5	Gelfiltrationschromatographische Reinigung der Enzymkonjugate .....	38
3.5.6	Charakterisierung der Enzymkonjugate .....	39
3.6	Immunchemische Methoden .....	41

3.6.1	Durchführung des ELISAs.....	41
3.6.2	Kalibrierung und Auswertung des ELISAs .....	43
3.6.3	Pipettierschema.....	43
3.6.4	Bestimmung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze .....	45
3.6.5	Kreuzreaktivitäten.....	46
3.6.6	Plattenkonservierung.....	46
3.6.7	LC-ELISA.....	47
3.7	<i>Referenzanalytik</i> .....	47
3.7.1	Festphasenanreicherung (SPE).....	47
3.7.2	LC-MS/MS .....	47
3.8	<i>Untersuchungen von Gewässerproben</i> .....	50
3.8.1	Probennahme .....	50
3.8.2	Probenvorbereitung .....	50
3.9	<i>Methodik der Literaturlauswertung</i> .....	51
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
4.1	<i>Kopplung von Carbamazepin an Meerrettichperoxidase</i> .....	52
4.1.1	Synthese eines Tracers ohne Spacer (CBZ-HRP).....	52
4.1.2	Synthese eines Tracers mit dem Spacer Triglycin (CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP) .....	53
4.2	<i>Charakterisierung der Enzymkonjugate</i> .....	54
4.2.1	MALDI-TOF-MS.....	55
4.2.2	UV/VIS Spektroskopie .....	56
4.2.3	Einfluss der Kopplungsdichte des Enzymkonjugats auf den ELISA .....	58
4.3	<i>Entwicklung des CBZ-ELISAs</i> .....	60
4.3.1	Stationäre Phase .....	60
4.3.2	Immobilisierung der Antikörper.....	62
4.3.3	Vergleich verschiedener CBZ-spezifischer Antikörper.....	63
4.3.4	Optimierung der Konzentrationen von Tracer und Antikörper .....	64
4.3.5	Inkubationszeit der Ligandenbindungsreaktion.....	67
4.3.6	Probenpuffer.....	68
4.3.7	Robustheit der Methode .....	69
4.3.8	Plattenkonservierung.....	71
4.4	<i>Selektivität des CBZ-spezifischen Antikörpers</i> .....	72
4.4.1	Kreuzreaktionen .....	73
4.4.2	Identifizierung von Kreuzreaktanden mit Hilfe eines LC-ELISAs .....	76
4.4.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Kreuzreaktivität .....	77



---

4.4.4	Beziehung zwischen chemischer Struktur und Kreuzreaktivität .....	80
4.4.5	Beurteilung der Kreuzreaktionen für die Gewässeranalyse mit dem CBZ-ELISA .....	85
4.5	<i>Quantifizierung von CBZ in Gewässern</i> .....	89
4.5.1	Validierung des ELISAs .....	89
4.5.2	Quantifizierung von Cetirizin und CBZ mit einem Dual-Analyt-Immunoassay .....	94
4.6	<i>Referenzanalytik: LC-MS/MS</i> .....	98
4.6.1	Optimierung der chromatographischen Bedingungen .....	98
4.6.2	Validierung der Referenzmethode .....	99
4.7	<i>Untersuchung von Gewässerproben</i> .....	103
4.7.1	Abwasser .....	103
4.7.2	Oberflächenwasser .....	107
4.7.3	Trinkwasser .....	113
4.7.4	Saisonale Schwankungen des Cetirizin-Pegels .....	114
4.8	<i>Auftreten der CBZ-Metaboliten in Gewässern</i> .....	115
4.8.1	Qualitative Untersuchungen .....	115
4.8.2	Quantitative Untersuchungen .....	120
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	123
6	<b>Anhang</b> .....	125
6.1	<i>Danksagung</i> .....	125
6.2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	127
6.3	<i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	128
6.4	<i>Tabellenverzeichnis</i> .....	132
6.5	<i>Publikationsverzeichnis</i> .....	135
6.6	<i>Ergänzende Daten</i> .....	137
7	<b>Literatur</b> .....	163



# 1 Einleitung

Das Vorkommen von Arzneimitteln in der aquatischen Umwelt hat in der vergangenen Dekade große Aufmerksamkeit erlangt. Von historischer Bedeutung ist der Fund der Clofibrinsäure, dem aktiven Metaboliten der lipidsenkenden Arzneimittel Clofibrat, Etofibrat und Etofyllinclofibrat. Diese Substanz wurde bereits 1976 im Ablauf einer Kläranlage in den USA gefunden [1], gelangte aber erst 1992 nach der Entdeckung im Berliner Grundwasser [2] in den Fokus weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen. Clofibrinsäure ist ein Konstitutionsisomer des Herbizids Mecoprop und wurde zufällig bei der massenspektrometrischen Analyse von Herbiziden in Grundwasser gefunden. Nach wiederholten Funden in Grund- und Oberflächengewässern [3-5] konnte das Auftreten von Clofibrinsäure mit dem Eintrag menschlicher Ausscheidungen über das Abwasser in Verbindung gebracht werden.

In der Folge wurden weitere Untersuchungen zum Vorkommen von Arzneimitteln in der aquatischen Umwelt angestoßen. In Deutschland wurden 1998 erste ausführliche Ergebnisse zum Vorkommen von Arzneimitteln in Abwasser und Oberflächenwasser veröffentlicht [6, 7]. Große Beachtung erlangte eine Studie über die Verbreitung von Arzneimitteln in Gewässern in den USA in den Jahren 1999-2000 [8]. In dieser Untersuchung wurde das Auftreten von 95 organischen Kontaminanten in 139 Gewässer in 30 Bundesstaaten untersucht. In 80 % der Gewässer wurde mindestens einer dieser Spurenstoffe gefunden.

In Deutschland produziert im Durchschnitt jeder Mensch etwa 120 L Abwasser pro Tag, wovon etwa 1 % Urin sind [9]. Über die menschlichen Ausscheidungen gelangen unzählige Arzneimittel in den Wasserkreislauf. Mehr als 50.000 verschiedene Arzneimittel sind in Deutschland zugelassen. 2700 verschiedene Arzneimittel (900 verschiedene Wirkstoffe) machen 90 % des deutschen Marktes aus [10, 11]. Zusätzlich zu den Ausscheidungen wird eine erhebliche Menge an abgelaufenen oder nicht mehr benötigten Medikamenten über die Toilette entsorgt und gelangt so ins Abwasser [12, 13].

Von den Spurenstoffen im Oberflächenwasser geht eine potentielle Gefahr für den Menschen und die Umwelt aus. Die Konzentrationen der Arzneistoffe in Gewässern und im Trinkwasser liegen gewöhnlich mehrere Größenordnungen unter der beim Menschen therapeutisch wirksamen Konzentration, so dass für den Menschen und viele im Wasser lebende Organismen keine akute toxikologische Relevanz zu erwarten ist.

Die chronische Toxizität dieser Spurenstoffe ist meistens weniger gut untersucht als die akute Toxizität [14]. Es gibt aber mittlerweile Untersuchungen, die die Gefahren des unkontrollierten Eintrags von Arzneimitteln und anderen Substanzen aus dem menschlichen Lebensbereich in die Umwelt verdeutlichen. Bekannt ist die hohe östrogene Aktivität des in vielen Kontrazeptiva verwendeten Hormons 17- $\alpha$ -Ethinylestradiol. Dieser Wirkstoff kann bereits bei Konzentrationen von 0,1 ng/L zu einer Verweiblichung von Regenbogenforellen führen [15] und dadurch die Größe der Population beeinflussen. Auch andere Fischarten und Weichtiere können bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen von 1 ng/L oder weniger durch östrogenartige Substanzen in ihrer Reproduktionsfähigkeit eingeschränkt sein [16, 17].

Diese sehr geringen Konzentrationen werden in den meisten Abwässern und in einigen Oberflächengewässern zum Teil deutlich überschritten [18]. Auch das entzündungshemmende Arzneimittel Diclofenac kann bei Regenbogenforellen schon in Konzentrationen von 1 µg/L, die in Abwasser häufig erreicht wird [19], zu chronischen Organschäden führen [20]. Ebenfalls erwähnenswert ist das Gefährdungspotential für den Menschen durch die Verbreitung resistenter Keime in Gewässern, die auf den steigenden Einsatz von Antibiotika zurückzuführen ist [21].

Neben kommunalen Abwässern können Arzneimittel auch auf anderen Wegen in die Umwelt gelangen und dort Schaden anrichten. Der Eintrag von Diclofenac in die Nahrungskette von Greifvögeln führte in Indien und Pakistan innerhalb weniger Jahre zu einer dramatischen Reduktion der dort ansässigen Geierpopulation um 95 % [22]. Die Ursache hierfür war die Behandlung von Rindern mit Diclofenac. Die über Rinderkadaver aufgenommenen Mengen an Diclofenac reichten aus, um bei den Vögeln zu einem Nierenversagen zu führen. Drei Geierarten sind dadurch nun vom Aussterben bedroht.

Diese Fälle zeigen deutlich, dass der unkontrollierte Eintrag von anthropogenen Substanzen zu nicht vorhersagbaren Konsequenzen auf die Umwelt und den darin befindlichen Lebewesen führt. Neben den Arzneimitteln gelangen auch Metabolite und Abbauprodukte in die Umwelt, deren toxikologische Relevanz in den meisten Fällen völlig unklar ist. Die Toxizität dieser Folgeprodukte kann durchaus höher sein als diejenige der ursprünglichen Verbindung, wie für ein phytotoxisches Phototransformationsprodukt von Diclofenac gezeigt wurde [23].

Die Staaten der Europäischen Union (EU) haben sich mit der Verabschiedung der Wasserrahmenrichtlinie verpflichtet, bis 2015 einen „guten Gewässerzustand“ zu erreichen [24]. Die hierzu erforderliche Gewässerüberwachung wird durch die Vielzahl an auftretenden Stoffen erschwert. Mit vertretbarem Aufwand können nicht alle in Gewässern auftretenden Substanzen quantifiziert werden.

Wegen seiner weiten Verbreitung und hohen chemischen Persistenz ist daher das Antiepileptikum Carbamazepin (CBZ) als Marker für die Präsenz abwasserbürtiger Substanzen in der aquatischen Umwelt vorgeschlagen worden [25-33]. Diese Substanz wird in geklärtem Abwasser in erheblichen Konzentrationen von bis zu 6,3 µg/L gefunden [6]. Da CBZ in Kläranlagen mit herkömmlicher zweiter Reinigungsstufe durch Klärschlamm kaum entfernt wird (s. Kapitel 2.2.3), kann es über den Klärwerksablauf in Oberflächengewässer und letztlich auch ins Trinkwasser gelangen. Der Marker CBZ ist für den Menschen bei den in Oberflächengewässern auftretenden Konzentrationen gesundheitlich unbedenklich [34]. Die akute Ökotoxizität ist vernachlässigbar gering [19], möglicherweise besteht aber für einige Arten eine chronische Toxizität [35, 36].

Die gängige Methode für die Quantifizierung von CBZ im Spurenbereich ist die Kopplung von Flüssigchromatographie (LC) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Nach einer vorherigen Festphasenanreicherung (SPE) werden üblicherweise Bestimmungsgrenzen (LOQ) von 10 ng/L oder weniger erreicht (s. Kapitel 2.3).

Bei der Quantifizierung von Stoffkonzentrationen in der Umwelt ist mit erheblichen Schwankungen zu rechnen [37-40]. Durch wechselnde Pegelstände und saisonale Einflüsse (landwirtschaftliche Düngung, Allergiesaison, Baden in Gewässern) können sich die

Stoffkonzentrationen in Gewässern erheblich ändern. Auch eine schwankende Einnahmehäufigkeit der Arzneimittel kann die Konzentrationen beeinflussen. Eine häufige Probennahme und Analyse ist daher unumgänglich, um diese Änderungen zu erfassen. Für diese Aufgabe bieten sich die auf Antikörpern basierenden Immunoassays an, da sie schnell und kostengünstig sind. Sie erfordern wenig Vorwissen, sind leicht erlernbar und können deshalb auch von ungeübtem Personal korrekt verwendet werden.

## 1.1 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, einen ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zu entwickeln und validieren, der für die Quantifizierung von CBZ in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser geeignet ist. Hierdurch soll eine kostengünstige Alternative zur gängigen LC-MS/MS-Methode geschaffen werden, die zeit- und personalaufwändig und mit erheblichen Kosten verbunden ist. Für die Untersuchung von CBZ existieren bereits mehrere Immunoassays, die auf monoklonalen Antikörpern oder polyklonalen Seren beruhen [41-45]. Diese Tests sind bislang ausschließlich für die Quantifizierung von CBZ in biologischen Proben im mg/L-Bereich verwendet worden.

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst die Entwicklung und Validierung des ELISAs dargestellt und diskutiert. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Charakterisierung des verwendeten Antikörpers gelegt. Die entscheidenden Bindungsstellen des Antikörpers werden anhand einer Untersuchung seiner Kreuzreaktionen kartiert. Darüber hinaus wird ein neuartiger Validierungsansatz benutzt, um weitere potentielle Kreuzreaktanden in Gewässern zu identifizieren: Nach einer flüssigchromatographischen Fraktionierung konzentrierten Abwassers werden die Fraktionen mit dem ELISA analysiert. Die kreuzreagierenden Bestandteile in positiven Fraktionen werden anschließend mit Hilfe hochauflösender MS identifiziert. Diese Kopplung von LC und ELISA wurde schon in anderen Arbeiten eingesetzt [46, 47] und führte zum Beispiel zur Entdeckung von neuen Beta-Agonisten [48] und Metaboliten [49]. Abschließend wird der ELISA bei der Untersuchung zahlreicher Proben von Kläranlagen, Flüssen, Seen und Trinkwasser aus dem Berliner Raum mit der Referenzmethode LC-MS/MS verglichen.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Der anthropogene Marker Carbamazepin (CBZ)

#### 2.1.1 Therapeutische Verwendung

CBZ (s. Abbildung 1) ist ein krampflösendes Arzneimittel, das vorwiegend zur Behandlung von Epilepsie angewendet wird. Darüber hinaus wird es begleitend bei der Therapie von Depressionen und Schmerzen eingesetzt, u.a. bei bipolaren Störungen, Schizophrenie und Trigeminusneuralgie [50, 51]. Die typische Tagesdosis beträgt 1000 mg [52].

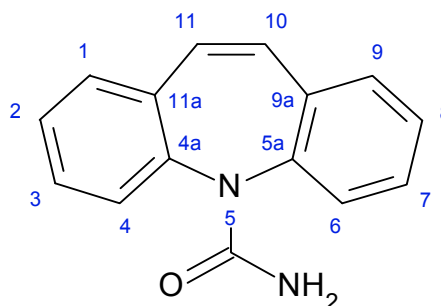
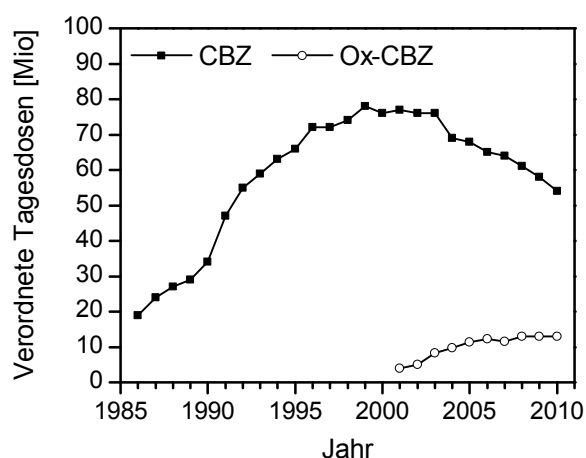


Abbildung 1: Struktur von CBZ.

In Deutschland werden jährlich ca. 60 t CBZ verschrieben [52, 53]. CBZ wird seit über 40 Jahren eingesetzt, wobei die Verschreibungsmengen seit 2003 leicht rückläufig sind (s. Abbildung 2) [54]. Mit Lamotrigin, Gabapentin, Oxcarbazepin (Ox-CBZ) und Topiramat sind inzwischen neue Wirkstoffe auf dem Markt, die als Alternativen zu CBZ in Betracht kommen. Diese Wirkstoffe bieten gegenüber CBZ keine entscheidenden Vorteile in der Wirksamkeit, sind in Einzelfällen aber besser verträglich [55, 56]. In Leitlinien wird CBZ weiterhin als Mittel der Wahl für die Erstbehandlung fokaler Epilepsien empfohlen [57, 58]. Diese Empfehlung mag auch der Grund für die stagnierenden Verschreibungszahlen von Ox-CBZ sein (s. Abbildung 2), das bei höheren Therapiekosten kaum Vorteile gegenüber CBZ bietet [59]. Es ist daher davon auszugehen, dass CBZ trotz moderner Alternativen weiterhin eine bedeutende Rolle auf dem Markt der Antiepileptika spielen wird.



Land	Verkaufte Menge an CBZ [t]	Pro-Kopf-Verbrauch [g/Jahr]
Belgien	8,4	0,81
Frankreich	31,8	0,53
Deutschland	81,6	0,99
Italien	35,9	0,62
Niederlande	9,0	0,55
Großbritannien	52,2	0,87
USA	158,6	0,56
EU gesamt	353	0,77

Abbildung 2: links: Verordnungszahlen von CBZ und Ox-CBZ in Deutschland in Millionen Tagesdosen von 1986-2010; ab 1991 einschließlich der neuen Bundesländer [60-63]; rechts: Verkaufsmengen und mittlerer Pro-Kopf-Jahresverbrauch von CBZ in ausgewählten Ländern 2004 [64], zitiert nach [34].

Die hohen Verschreibungsmengen von CBZ mögen angesichts der relativ geringen Verbreitung von Epilepsie zunächst überraschen. Bei ununterbrochener täglicher Behandlung entsprechen die knapp 60 Millionen verordneten Tagesdosen in 2009 einer Zahl von 160.000 Patienten. Dies entspricht 0,23 % der 70,0 Millionen Mitglieder der gesetzlichen Krankenkassen und liegt damit unter der Prävalenz der Epilepsien in der Bevölkerung: Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO leiden zwischen 0,4 und 1 % der Bevölkerung unter wiederkehrenden Anfällen oder bedürfen einer Behandlung [65].

### 2.1.2 Struktur

CBZ zeigt einen Polymorphismus und kann in vier verschiedenen Modifikationen vorkommen [66-69], wobei Form III die bei Raumtemperatur energetisch günstigste ist. Diese Formen unterscheiden sich vornehmlich durch die Molekülstapelung, das rigide Dibenzazepin-Gerüst ist bei allen Formen annähernd identisch.

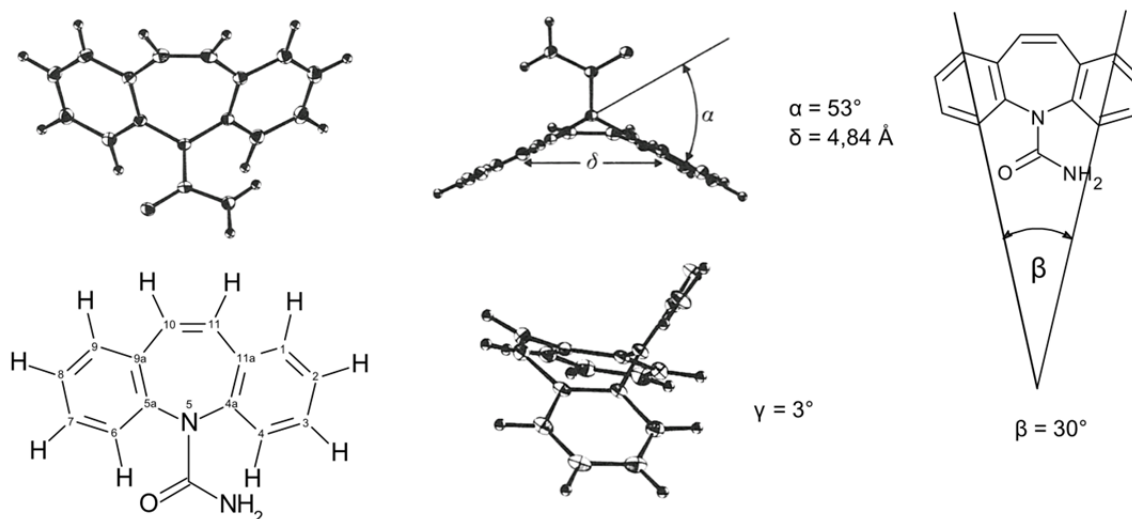


Abbildung 3: Kristallstruktur von Carbamazepin und Veranschaulichung des Biegungswinkels  $\alpha$ , des Anellierungswinkels  $\beta$ , des Torsionswinkels  $\gamma$  (C11a-C4a-C5a-C9a) und des Abstands  $\delta$  zwischen den beiden Schwerpunkten der Phenyleinheiten. Abbildungen entnommen aus [70].

Die Struktur von CBZ lässt sich anhand von vier räumlichen Parametern beschreiben (s. Abbildung 3), die sich in früheren Untersuchungen zur Charakterisierung der Struktur von trizyklischen Arzneimitteln als zweckmäßig erwiesen haben [71]. Der zentrale Azepinring nimmt eine bootförmige Konformation ein. Die anellierten Benzoleinheiten befinden sich nicht in einer Ebene mit der Azepineinheit und bilden eine schmetterlingsähnliche Geometrie. Der Biegungswinkel  $\alpha$  zwischen den beiden Schmetterlingsflügeln beträgt  $53^\circ$  und ist damit aufgrund des Raumbedarfs der Carbamoylgruppe etwas größer als in Dibenzazepin ( $\alpha = 35^\circ$ ). Eine Inversion dieser Geometrie, bildlich gesprochen ein Schlagen der Schmetterlingsflügel, ist möglich. Für den CBZ-Metaboliten DiOH-CBZ wurde eine relativ geringe Aktivierungsenergie von 67 kJ/mol bestimmt [72]. Die trizyklische Grundstruktur ist annähernd spiegelsymmetrisch, die Spiegelebene verläuft dabei durch das zentrale Stickstoffatom N5 sowie durch den Mittelpunkt zwischen den Atomen C10 und C11. Diese Symmetrie spiegelt sich in einem geringen Torsionswinkel  $\gamma$  wider.

Aus der Elektronendichteverteilung semiempirischer Molekülorbital-Berechnungen ließ sich folgern, dass die  $\pi$ -Elektronen der Doppelbindung in 10,11-Stellung lokalisiert sind und somit die Aromatizität auf die isolierten Phenylringe beschränkt ist [73]. Dies spiegelt sich auch in der erhöhten Reaktivität der Doppelbindung in 10,11-Position wider, die leicht einer Hydrierung oder Brom-Addition unterzogen werden kann.

Bedingt durch das relativ große unpolare Kohlenstoffgerüst ist CBZ lipophil und vergleichsweise schlecht wasserlöslich. Die Löslichkeit in PBS-Puffer (pH 7,4) beträgt 72 mg/L [74], für Reinstwasser sind Werte von 130 bis 260 mg/L publiziert [75-77]. In etlichen Publikationen kursiert außerdem eine theoretische Wasserlöslichkeit von 17,7 mg/L, die auf Berechnungen auf Grundlage des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten zurückgeht [78].

### 2.1.3 Metabolismus

Lipophile, neutrale Substanzen wie CBZ können in unveränderter Form vom menschlichen Körper nur schwierig wieder ausgeschieden werden [79]. Hierfür ist zunächst eine Biotransformation in ein hydrophileres und damit besser nierengängiges Produkt erforderlich. Im Phase-I-Metabolismus findet zunächst die Funktionalisierung statt. Im anschließenden Phase-II-Metabolismus können aus diesen Produkten hydrophile Konjugate wie Glucuronide, Glutathionide oder Sulfate gebildet werden. Mittlerweile sind über 30 Abbauprodukte von CBZ bekannt (s. Tabelle 1).

In Experimenten mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem CBZ wurden in gesunden Probanden 72 % der Radioaktivität im Urin und 28 % im Kot ausgeschieden [80]. Die rektale Ausscheidung der Metaboliten wurde bislang nur in einer Studie untersucht. Im Kot zweier gesunder Probanden wurden 10 bzw. 15 % der Gesamtdosis unverändert ausgeschieden [80]. Über die Zusammensetzung der restlichen Anteile im Kot ist nichts bekannt.

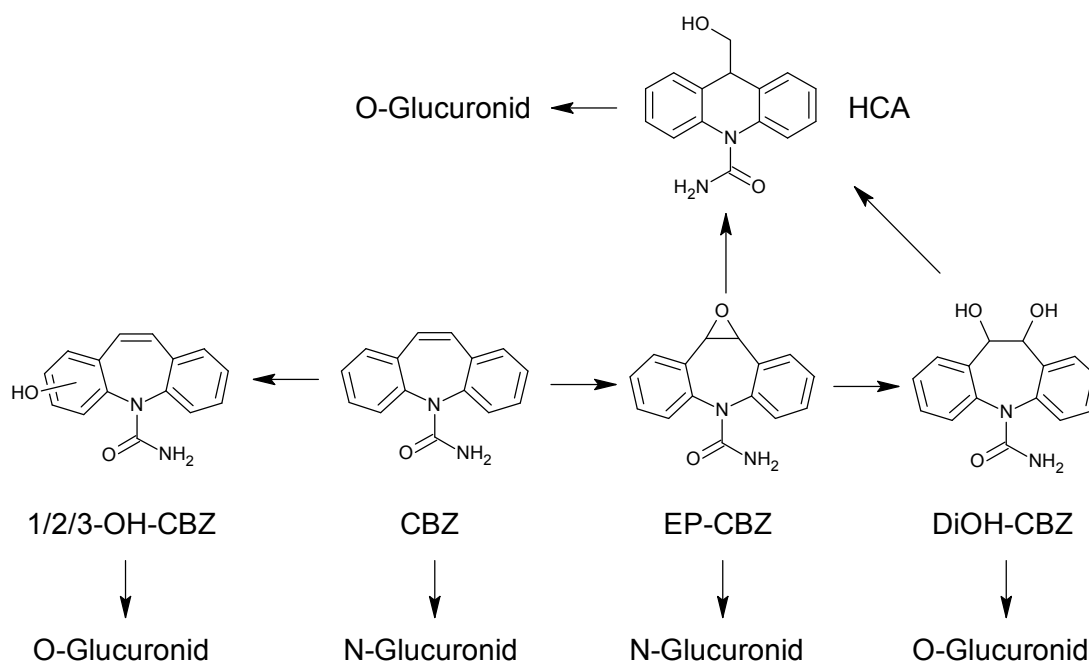


Abbildung 4: Abbau von CBZ im menschlichen Körper.



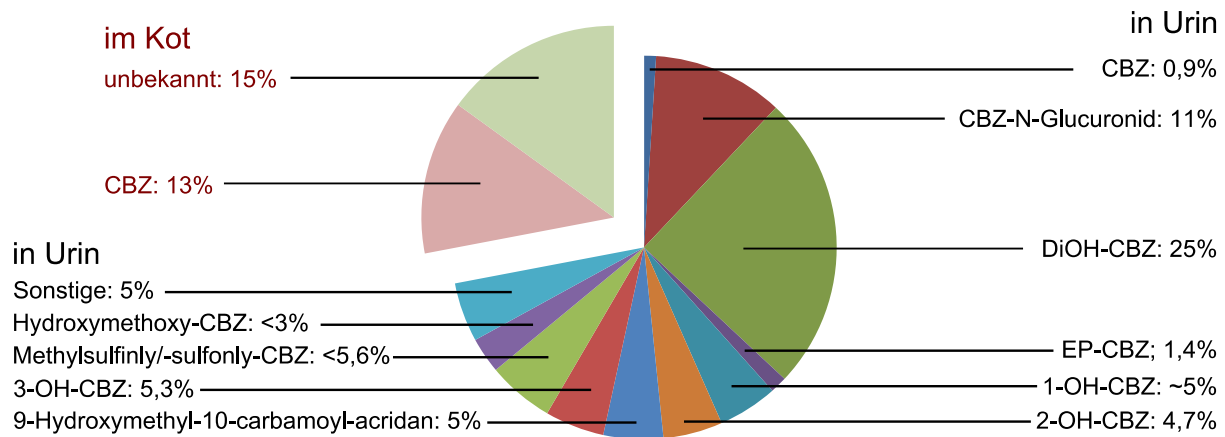


Abbildung 5: Zusammensetzung der CBZ-Metaboliten in Urin und Kot. Mit Ausnahme von CBZ-N-Glucuronid sind die Konjugate nicht gesondert aufgeführt, sondern mit der Ursprungssubstanz zusammengefasst.

Etwa 1 % der Gesamtdosis wird renal unverändert ausgeschieden [74, 81-84]. Die Zusammensetzung der restlichen Bestandteile im Urin wurde in mehreren Studien untersucht und ist recht gut bekannt. Im Wesentlichen findet der Abbau über zwei Pfade statt, die in Abbildung 4 dargestellt sind. In der Leber wird der größte Teil des CBZ durch Enzyme aus der Familie Cytochrom P450 (CYP450) zunächst zu 10,11-Epoxycarbamazepin (EP-CBZ) umgesetzt [85]. Hieraus entsteht durch enzymatische Hydrolyse rasch 10,11-Dihydro-trans-10,11-dihydroxycarbamazepin (DiOH-CBZ) [86]. Aus EP-CBZ und DiOH-CBZ kann sich durch Ringverengung 9-Hydroxymethyl-10-carbamoylacridan (HCA) bilden [81]. Die Anteile von EP-CBZ, DiOH-CBZ und HCA an der ausgeschiedenen Gesamtdosis betragen im Mittel etwa 0,9 %, 25 % bzw. 5 % (s. Abbildung 5).

Der zweite Abbaupfad führt zu einer Hydroxylierung an den aromatischen Ringen, die ebenfalls enzymatisch unter Beteiligung von CYP450 stattfindet [87]. Jeweils etwa 5 % der Gesamtdosis werden als 2-Hydroxycarbamazepin (2-OH-CBZ) und 3-OH-CBZ ausgeschieden [82, 83, 88]. Die Anteile der übrigen Metaboliten wurden bislang nicht separat quantifiziert. Faigle et al. berichteten, dass die phenolischen Metaboliten 1-OH-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ in etwa gleichen Teilen im Urin auftreten [74]. Gemeinsam mit 2-Hydroxy-1-methoxy-CBZ und 2-Hydroxy-3-methoxy-CBZ tragen sie zu etwa 18 % der ausgeschiedenen Gesamtdosis im Urin bei [81]. Hieraus lässt sich abschätzen, dass die beiden Hydroxymethoxy-Metaboliten insgesamt weniger als 3 % der Gesamtdosis ausmachen. 4-OH-CBZ ist ebenfalls nachweisbar, tritt aber nur in Spuren auf [81]. Eine weitere Gruppe wird von Methylsulfinyl- und Methylsulfonylderivaten gebildet, von denen keines mehr als 1,4 % der ausgeschiedenen Dosis ausmacht [81].

Darüber hinaus ist ein weiterer Reaktionsweg dokumentiert, bei dem zunächst die Carbamoyl-Gruppe abgespalten wird. In der Folge kommt es zur Bildung von Iminostilben, Acridin, Acridon, 2-Hydroxyiminostilben und 9-Acridin-10-carboxaldehyd [89-91]. Im Urin treten diese Metaboliten nur in vernachlässigbaren Konzentrationen auf [81].

Viele der Metaboliten werden als Glucuronide ausgeschieden. Sowohl CBZ als auch EP-CBZ bilden N-Glucuronide [92, 93]. Etwa 11 % des eingenommenen CBZ wird über den Urin als N-Glucuronid ausgeschieden [81]. DiOH-CBZ liegt etwa zu einem Drittel als O-Glucuronid vor [80], während 1-OH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ und HCA fast vollständig

zum O-Glucuronid umgesetzt werden [81]. Die Hydroxymethoxy-Metaboliten liegen ebenfalls überwiegend als O-Glucuronid vor [93]. Als weitere Konjugate treten in geringerem Umfang auch Glutathionide [94] und Sulfate [95] auf.

*Tabelle 1: Metaboliten von CBZ und ihr Vorkommen in Urin, Anteile als Mittelwert aller Messwerte, in Klammern Spannweite der Werte.*

Metabolit	Anteil an renal ausgeschiedener Gesamtdosis	Referenz
CBZ	0,9 % (0,5-2 %)	d, e, j, k, l, m
CBZ-N-Glucuronid	11 %	e
<i>trans</i> -DiOH-CBZ	25 % (10-35 %)	d, e, j, k, l
EP-CBZ	1,4 % (1-2,6 %)	d, e, j, k, l, m
1-OH-CBZ	2-10 %	d
2-OH-CBZ	4,7 % (2-10 %)	d, j, k
3-OH-CBZ	5,3 % (2-10 %)	d, j, k
4-OH-CBZ	<< 2 %	e
9-Hydroxymethyl-10-carbamoylacridan (HCA)	5,0 % (2-10 %)	d, e, j, k, l
10-OH-CBZ	< 0,1 %	d
Iminostilben	< 0,1 %	d, m
<i>cis</i> -DiOH-CBZ	< 0,1 %	d, m
2-Methylsulfinyl-CBZ	< 1,4 %	e
3-Methylsulfinyl-CBZ	< 1,4 %	e
2-Methylsulfonyl-CBZ	< 1,4 %	e
3-Methylsulfonyl-CBZ	< 1,4 %	e
2-Hydroxy-1-methoxy-CBZ	< 3 %	<sup>e</sup> (s. Text)
2-Hydroxy-3-methoxy-CBZ	< 3 %	<sup>e</sup> (s. Text)
Acridin	< 0,1 %	e
Acridon	< 0,1 %	e
1,2-Dihydroxy-CBZ		h
2,3-Dihydroxy-CBZ		h
? ,3-Dihydroxy-CBZ <sup>1</sup> (2x) <sup>2</sup>		h
1,4-Dihydroxy-1,4-dihydro-CBZ		h
Trans-2,3-dihydroxy-2,3,-dihydro-CBZ		h
10,11,?-Trihydroxy-10,11-dihydro-CBZ <sup>1</sup>		h
10-Hydroxyiminostilben		h
2-Hydroxyiminostilben		h
Dihydroxyiminostilben		h
10,11,?-Trihydroxy-10,11-dihydroiminostilben <sup>1</sup>		h
3,10,11-Trihydroxy-10,11-dihydroiminostilben <sup>1</sup>		h
Methylsulfinylhydroxyiminostilben (4x) <sup>2</sup>		h
Hydroxy-9-hydroxymethylacridan		h
10-Hydroxy-10,11-dihydroiminostilben		h
9-Acridin-10-carboxaldehyd		i

<sup>1</sup> ?: Substituentenposition ungeklärt

<sup>2</sup> mehrere Isomere vorhanden

Ref.: <sup>a</sup> [92], <sup>b</sup> [96], <sup>c</sup> [97], <sup>d</sup> [74], <sup>e</sup> [81], <sup>f</sup> [96], <sup>g</sup> [98], <sup>h</sup> [99], <sup>i</sup> [90], <sup>j</sup> [82], <sup>k</sup> [83], <sup>l</sup> [88], <sup>m</sup> [84]

Die erhobenen Daten sind mit Vorsicht zu betrachten, da sie in vielen Fällen auf Einzelgaben von CBZ an gesunde Probanden beruhen. Hierbei bleibt die Autoinduktion des CYP450-Metabolismus unberücksichtigt, die nach einer 6 bis 10 tägigen Einnahme von CBZ einsetzt und zu einem beschleunigten CBZ-Abbau führt [82, 88, 100]. Dies äußert sich durch etwas höhere Pegel von DiOH-CBZ und HCA im Urin [88]. Eine ähnliche Beschleunigung des Metabolismus kann auch bei kombinierter Verabreichung von CBZ mit anderen Antiepileptika auftreten. In einem Fall wurde dabei der Anteil von DiOH-CBZ an der gesamten ausgeschiedenen Dosis auf 60 % mehr als verdoppelt [101]. Da CBZ üblicherweise als Prophylaxe gegen epileptische Anfälle dauerhaft verabreicht wird, ist bei den meisten Patienten mit einer abweichenden Zusammensetzung der Metaboliten im Urin auszugehen als in Abbildung 5 dargestellt. Insbesondere die Anteile von DiOH-CBZ und HCA dürften etwas höher liegen.

## 2.1.4 Verwendung von anthropogenen Markern

Der Eingriff des Menschen in die aquatische Umwelt lässt sich mit Hilfe von anthropogenen Markern verfolgen. Sie sind ein wichtiges Hilfsmittel für eine Quellenzuordnung. Mit Hilfe des künstlichen Markers Fluorescein wurde bereits 1877 die unterirdische Verbindung zwischen den Flüssen Donau und Aach entdeckt [102]. Von technischem Nutzen sind anthropogene Marker beim Nachweis der Exfiltration von Abwasser aus undichten Rohrsystemen [103, 104]. Neben dem eingangs erwähnten CBZ sind mehrere weitere anthropogener Marker für den Einsatz in der aquatischen Umwelt in Gebrauch (s. Tabelle 2).

*Tabelle 2: Anthropogene Marker*

Stoff	Herkunft/Anwendung	Marker für
CBZ	Arzneimittel	Geklärttes Abwasser
Sucralose, Acesulfam	Süßstoffe	Geklärttes Abwasser
Gadolinium, Iopromid, etc.	Medizinische Kontrastmittel	Geklärttes Abwasser
Bor	Waschmittel	Geklärttes Abwasser
Kalium	Urin	Geklärttes Abwasser
Koffein	Genußmittel (Kaffee, Tee, etc.)	Ungeklärttes Abwasser

Einige Süßstoffe wie Sucralose oder Acesulfam werden ähnlich wie CBZ kaum in Kläranlagen abgebaut [105, 106] und kommen deshalb als anthropogene Marker in Frage. Vorteilhaft ist, dass ihre Konzentrationen im Abwasser gewöhnlich im zweistelligen µg/L-Bereich liegen und damit eine Größenordnung höher als CBZ.

Nach zahlreichen Funden in Oberflächengewässern und Grundwasser wurden auch medizinische Kontrastmittel wie Gadolinium [107, 108] oder Iopromid [109, 110] als Marker diskutiert. Für den Einsatz als Abwassertracer ist nachteilig zu bewerten, dass mit erheblichen Konzentrationsunterschieden zwischen verschiedenen Klärwerken zu rechnen ist, da nuklearmedizinische Einrichtungen in der Fläche nicht gleichmäßig verteilt sind. Auch beschränkt sich die medizinische Anwendung in den meisten Fällen auf Werktage, so dass am Wochenende deutlich weniger Kontrastmittel im Abwasser gefunden werden [109, 111].

Ebenso sind innerhalb eines Tages beträchtliche Konzentrationsschwankungen berichtet worden [112].

Natriumperborat fällt in großen Mengen als Bleichzusatz in Waschmitteln an. Aufgrund der geringen Eliminierungsrate in Klärwerken wurde Bor als Marker für Abwasser vorgeschlagen [113-115]. Der Einsatz als anthropogener Marker wird durch die oftmals hohe Hintergrundkonzentration von Bor erschwert. Insbesondere im Grundwasser treten Konzentrationen von mehr als 100 µg/L bis über 1000 µg/L auf, während in Abwasser Werte von 800-1500 µg/L typisch sind [116]. Da in Europa die Bor-Konzentrationen in Oberflächengewässern wegen des abnehmenden Einsatzes in Waschmitteln rückläufig sind [116, 117], ist mit einer sinkenden Verwertbarkeit dieses Markers zu rechnen. Als Vorteil kann gelten, dass die Quantifizierung mittels Atomemissionsspektrometrie weniger aufwändig ist als die Detektion der organischen Marker mit HPLC-MS/MS.

Ein weiterer anorganischer Abwassermarker ist Kalium, das zum größten Teil über den menschlichen Urin ins Abwasser gelangt [118]. Kalium ist bei Trockenwetter ein geeigneter Marker, wie von Nödler et al. anhand der guten Korrelation zwischen den Abwassermarkern CBZ und Kalium gezeigt wurde [119]. Bei Regen kann hingegen insbesondere nach landwirtschaftlicher Düngung Kalium aus dem Erdreich ausgewaschen werden und in die Flüsse gelangen [120, 121]. Im Winter ist zudem mit erhöhten Konzentrationen durch Streusalz zu rechnen.

Ungeklärtes Abwasser kann über den Marker Koffein identifiziert werden, das im Klärwerk nahezu vollständig abgebaut wird [122]. Die Konzentrationen von Koffein in ungeklärtem Abwasser sind mit Werten bis zu 640 µg/L bemerkenswert hoch [123]. Ein erheblicher Teil des in die Umwelt eingetragenen Koffeins gelangt durch den Überlauf des Kanalisations-systems bei Starkregeneignissen in die Umwelt [124]. In karstigen Regionen kann es dann sogar das Grundwasser erreichen [125]. Mit einem ELISA steht eine schnelle und kostensparende Analysemethode für den Nachweis von Koffein zur Verfügung [126].

## 2.2 Carbamazepin in der Umwelt

### 2.2.1 Auftreten in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser

Das Vorkommen von CBZ in Abwasser und Oberflächengewässern wurde in einer Literaturstudie analysiert, für die insgesamt 126 Untersuchungen herangezogen wurden (s. Tabelle 3). Bei den meisten Studien handelt es sich um Stichprobenuntersuchungen, die nicht als repräsentativ gelten können. In einigen Studien wurden zudem gezielt besonders belastete Gewässer untersucht.

Tabelle 3: Vorkommen von CBZ in Oberflächenwasser und Abwasser. Angegeben sind der Median (Med.) und die Höchstkonzentration (Max.) aller untersuchten Studien in ng/L sowie die Gesamtzahl aller Proben n (k.A.: keine Angabe, >: mehr als). Die Anzahl der betrachteten Studien steht in Klammern (s. Tabelle 31 im Anhang).

Land	Oberflächengewässer			Ungeklärtes Abwasser			Gekklärtes Abwasser		
	Med.	Max.	n	Med.	Max.	n	Med.	Max.	n
<i>Europa</i>									
Belgien	435	1005	8 (1)						
Bulgarien	109	205	2 (1)						
Deutschland	220	7100	2891 (17)	1525	3800	> 243 (10)	1470	6300	> 355 (18)
Dänemark	15	15	1 (1)				940	940	1 (1)
Estland	3	15	3 (1)						
Finnland	41	370	> 13 (4)	333	2000	> 24 (3)	400	2440	> 24 (3)
Frankreich	64	6720	> 127 (9)	286	416	3 (1)	950	2519	> 34 (9)
Griechenland	< 1	< 1	1 (1)				605	1030	2 (1)
Großbritannien	86	356	> 165 (6)	1322	2930	> 20 (1)	652	4598	> 26 (3)
Irland	55	55	1 (1)	200	720	39 (2)	1901	6500	39 (2)
Italien	88	345	44 (4)				301	1318	22 (4)
Kroatien				420	950	5 (1)	410	630	5 (1)
Litauen	15	17	4 (1)						
Luxemburg	60	69	3 (1)						
Malta	< 1	3	3 (1)						
Niederlande	133	203	4 (1)						
Norwegen	10	27	10 (2)				344	393	2 (1)
Österreich	47	294	> 26 (5)	850	2640	> 51 (5)	952	1970	> 75 (5)
Polen	333	794	7 (2)	1150	1600	k.A. (1)			
Portugal	146	146	1 (1)				520	540	2 (1)
Rumänien	31	75	21 (3)				466	774	5 (1)
Schweden	209	740	14 (2)	980	1680	2(2)	665	1180	4(4)
Schweiz	61	239	> 15 (3)	765	2370	> 9 (2)	590	2000	> 9 (2)
Slowenien	12	16	8 (1)						
Spanien	30	219	32 (5)	340	3780	366 (6)	146	1550	390 (8)
Tschechien	113	214	5 (1)						
Türkei	187	306	2 (1)						
Ungarn	102	293	6 (1)						
Zypern	5783	11561	2 (1)						
<i>Australien und Asien</i>									
Australien				1480	1480	1 (1)			
China	15	1090	> 26 (2)	100	510	10 (3)	258	1110	11 (4)
Israel							975	1700	12 (2)
Japan	19	65	71 (2)	54	270	16 (1)	52	163	> 18 (2)
Jordanien	240	1600	k.A. (1)				1800	3600	5 (1)
Südkorea	25	595	39 (3)	151	2350	> 21 (3)	190	1940	> 38 (5)
Taiwan	40	120	3 (1)	195	357	4 (1)	352	960	7 (2)
<i>Nordamerika</i>									
Costa Rica	< 1	82	68 (1)						
Kanada	4	1030	28 (5)	369	1900	32 (7)	282	2300	26 (7)
Mexiko							226	275	3 (1)
USA	40	1500	262 (9)	57	100	5 (3)	115	800	174 (12)

### *Abwasser*

Das Auftreten von CBZ in deutschen Abwässern ist in zahlreichen Publikationen beschrieben worden. Im Klärwerkszulauf wurden im Median aller Untersuchungen 1,53 µg/L CBZ gefunden, im Ablauf 1,47 µg/L. Die Höchstkonzentrationen betrugen 3,8 µg/L im Zulauf bzw. 6,3 µg/L im Ablauf. Auch in allen übrigen untersuchten Ländern wurden erhebliche Mengen CBZ gefunden. Mit Ausnahme der USA und Japan lagen die CBZ-Konzentrationen sowohl im Zulauf als auch im Ablauf im drei- bis vierstelligen ng/L-Bereich.

Die niedrigeren Konzentrationen in den USA dürften zumindest teilweise mit dem erheblich höheren Pro-Kopf-Wasserverbrauch und der damit einhergehenden höheren Verdünnung der Kontaminanten zu erklären sein. Auch sind die Pro-Kopf-Verschreibungszahlen in den USA nur etwa halb so hoch wie in Deutschland (s. Abbildung 2).

Die vorliegenden Daten zeigen, dass CBZ quasi in der gesamten westlichen Welt sowie in vielen Schwellenländern im Abwasser zu finden ist. CBZ kommt daher weltweit als Abwassermarker in Frage. Die Konzentrationen liegen üblicherweise im dreistelligen ng/L-Bereich mit Höchstwerten oberhalb der µg/L-Grenze.

### *Oberflächengewässer*

Über die genaue Verbreitung in deutschen Gewässern existieren keine flächendeckenden Erkenntnisse, da die CBZ-Konzentrationen in Oberflächengewässern von behördlicher Seite nicht routinemäßig überprüft werden. Gut dokumentiert sind die Konzentrationen von CBZ im Rhein [39]. Hier liegen über einen Zeitraum von 10 Jahren Messdaten aus monatlichen Schöpfproben vor. Im Durchschnitt wurden an den vier Messstellen entlang des Rheins 0,078 µg/L CBZ gefunden. Dabei wurden erhebliche zeitliche Schwankungen beobachtet (Höchstkonzentration: 0,64 µg/L), wobei kein signifikanter Einfluss der Jahreszeiten festgestellt werden konnte. Seit 2003 nahmen die CBZ-Frachten ab, was nur teilweise mit den leicht abnehmenden Verschreibungszahlen erklärbar ist (s. Abbildung 2). Ebenfalls gut dokumentiert ist das Vorkommen von CBZ in der Elbe, in der im Median 0,055 µg/L gefunden wurden [127], sowie in den Berliner Gewässern (s. Kapitel 2.2.2).

Im Median wurden in deutschen Oberflächengewässern 0,22 µg/L CBZ gefunden. Andere Literaturstudien fanden mit anderer Datenbasis und anderer Methodik eine durchschnittliche CBZ-Konzentration von 0,50 µg/L [19] oder 0,45 µg/L [128] in deutschen Oberflächengewässern. In zahlreichen Fällen wurden Höchstwerte oberhalb von 1 µg/L bis maximal 7,1 µg/L gefunden [127]. Damit gehören die CBZ-Konzentrationen in deutschen Oberflächengewässern zu den höchsten weltweit.

Ebenfalls sehr hohe Höchstkonzentrationen von mehr als 1 µg/L wurden in Frankreich, China, Jordanien, Kanada und den USA gefunden. Mit 11,6 µg/L wurde die mit Abstand höchste CBZ-Konzentration in einer einzelnen Probe in Zypern gefunden [129]. Im Median lagen die CBZ-Konzentrationen in den meisten untersuchten Ländern im zwei- bis dreistelligen ng/L-Bereich.

## Grundwasser

Durch Uferfiltration, künstliche Grundwasseranreicherung und natürliche Versickerung kann CBZ ins Grundwasser gelangen [130]. CBZ ist in Deutschland in zahlreichen Studien im Grundwasser nachgewiesen worden [131-133], wobei die Höchstkonzentration 900 ng/L betrug [131]. Loos et al. untersuchten das Grundwasser in 23 europäischen Ländern [134]. In 42 % der Proben wurde CBZ oberhalb der Nachweisgrenze von 0,5 ng/L gefunden. Im Durchschnitt lag die Konzentration bei 12 ng/L, die Höchstkonzentration betrug 390 ng/L. Auch in weiteren Studien in Europa [135], in den USA [28, 136-138] und in Mexiko [139] wurde CBZ im Grundwasser gefunden. In den meisten Fällen lagen die gemessenen Konzentrationen deutlich unterhalb von 100 ng/L.

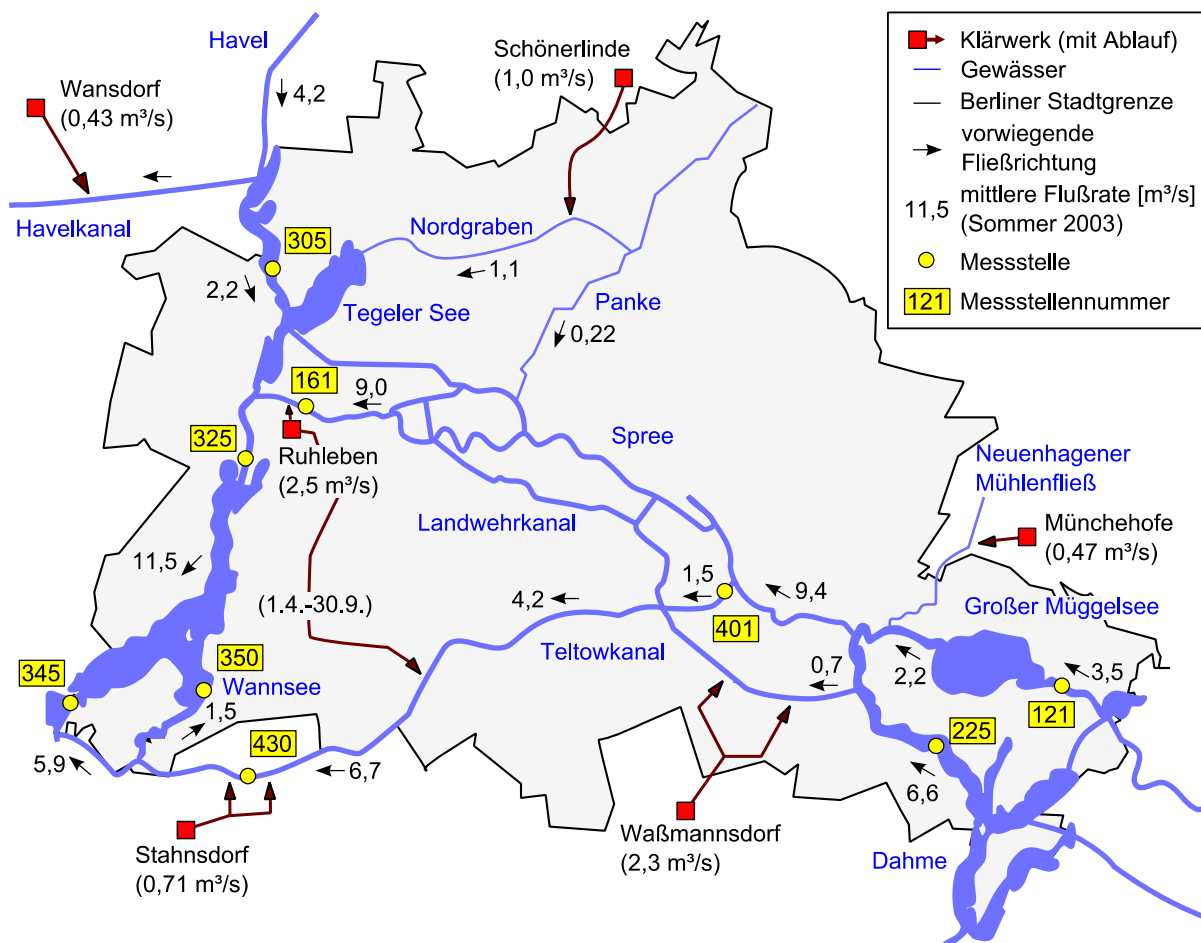


Abbildung 6: Lage der Gewässer und Klärwerke in Berlin. Die eingezeichneten Fließrichtungen und mittleren Flussraten wurden für den Sommer 2003 bestimmt [140]. Nicht eingezeichnet sind die Wasserentnahmen durch Grundwasseranreicherung und Uferfiltration.

### 2.2.2 Situation in Berlin

Das Berliner Gewässersystem besteht neben den Hauptzuflüssen Spree und Havel aus zahlreichen Seen und Kanälen (s. Abbildung 6). Die Fließgewässer zeichnen sich durch ein geringes Gefälle und eine geringe Fließgeschwindigkeit aus. Im Jahresdurchschnitt beträgt

die Zuflussrate der Berliner Gewässer 46 m<sup>3</sup>/s, was im Vergleich mit Rhein (2300 m<sup>3</sup>/s) und Elbe (870 m<sup>3</sup>/s) sehr wenig ist [141]. Diese Zahl kann abhängig von den Witterungsbedingungen stark schwanken. Abbildung 6 zeigt die Flussraten und Fließrichtungen im Sommer des trockenen Jahres 2003, in dem die für Havel und Spree aus wasserwirtschaftlicher Sicht minimal erforderlichen Zuflussraten von 6 m<sup>3</sup>/s bzw. 8 m<sup>3</sup>/s deutlich unterschritten wurden [140]. Abgesehen von den Witterungsbedingungen wird die Flussrate der Spree ganzjährig durch die Wiederauffüllung der Grundwasserbestände vermindert, die vor der deutschen Wiedervereinigung während des Braunkohletagebaus in der Lausitz entleert wurden [142]. Infolgedessen kann es zu einer Umkehrung der Fließrichtung der Spree kommen [143].

### *Eintrag von Abwasser*

Die von den sechs Berliner Klärwerken durchschnittlich abgeführte Menge an Abwasser betrug 2006 7,3 m<sup>3</sup>/s [140]. Die geringen Fließgeschwindigkeiten der Berliner Gewässer bedingen eine lange Aufenthaltszeit sowie eine geringe Verdünnung des eingeleiteten Abwassers. Besonders im Sommer besteht ein erheblicher Teil des Berliner Oberflächenwassers aus geklärtem Abwasser.

Eine besondere Rolle in der Abwasserentsorgung spielt der Teltowkanal, der im Osten aus der Dahme gespeist wird. Auf seinem Weg nach Westen in die Havel bzw. in den Wannsee wird aus den Klärwerken Waßmannsdorf und Stahnsdorf ganzjährig Abwasser eingeleitet. Vom 1. April bis 30. September wird zusätzlich über eine Druckrohrleitung Abwasser aus dem Klärwerk Ruhleben in den Teltowkanal gepumpt. Dies geschieht, um in den Badestellen an der Havel die Wasserqualität zu verbessern.

*Tabelle 4: Literaturübersicht über CBZ-Konzentrationen im Zulauf und Ablauf der Berliner Klärwerke, n bezeichnet die Anzahl der Stichproben.*

Klärwerk	CBZ-Konzentration, Median [µg/L]	
	Zulauf	Ablauf
Ruhleben	1,5 (n = 16) <sup>a</sup>	1,7 (n = 122) <sup>b</sup> ; 1,5 (n=16) <sup>a</sup>
Stahnsdorf	-	2,7 (n = 7) <sup>b</sup>
Schönerlinde	2,5 (n = 15) <sup>a</sup>	3,3 (n = 10) <sup>b</sup> ; 2,5 (n = 14) <sup>a</sup>
Waßmannsdorf	2,0 (n = 15) <sup>a</sup>	2,4 (n = 9) <sup>b</sup> ; 2,3 (n = 16) <sup>a</sup>
Münchehofe	2,7(n = 26) <sup>a</sup>	3,2 (n = 3) <sup>b</sup> ; 2,6 (n = 26) <sup>a</sup>
Wansdorf	-	3,7 (n = 2) <sup>b</sup>

Ref: <sup>a</sup>[144] (2006-2007); <sup>b</sup>[133, 145] (2000-2003)

Das Vorkommen von CBZ in den Berliner Klärwerken und Oberflächengewässern ist in den Jahren 2000-2007 in vier an der Technischen Universität Berlin entstandenen Dissertationen untersucht worden. [133, 144-146]. Tabelle 4 zeigt die CBZ-Konzentrationen, die in den Berliner Klärwerken im Zulauf und Ablauf gefunden wurden. Im Median lagen die Werte bei allen Klärwerken zwischen 1,5 und 3,7 µg/L und damit etwas höher als die Median-Konzentration im übrigen Bundesgebiet (s. Kapitel 2.2.1). Ein Abbau von CBZ im Klärwerk wurde nicht festgestellt.



Tabelle 5: CBZ-Konzentrationen [ $\mu\text{g/L}$ ] in ausgewählten Oberflächengewässern in den Jahren 2000 bis 2003 [133, 146], n bezeichnet die Anzahl der Stichproben.

Messstelle	Median	Maximum	n
121 Müggelspree, Rahnsdorf	0,045	0,060	10
161 Spree nahe Sophienwerder	0,19	0,64	10
225 Dahme, Langer See Bammelecke	0,035	0,080	23
305 Oberhavel, Konradshöhe	0,040	0,085	25
325 Havel, Pichelsdorfer Gemünd	0,27	0,63	28
345 Unterhavel, Krughorn	0,32	0,59	24
350 Großer Wannsee, Strandbad	0,38	0,57	9
401 Britzer Verbindungskanal nahe Spreeabzweigung	0,40	1,3	9
430 Teltowkanal, Schleuse Kleinmachnow	0,86	1,9	27

Der CBZ-Gehalt von Oberflächengewässern wurde von K. Reddersen und M. Adam untersucht, wobei von beiden Autoren zum Teil identische Messstellen beprobt wurden. Die Median- und Höchstkonzentrationen dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Die CBZ-Konzentrationen in den Zuflüssen sind vor der Durchquerung des Stadtgebietes sehr niedrig. In der Oberhavel (Messstelle 305), der Dahme (Messstelle 225) und der Müggelspree (Messstelle 121) wurden im Median zwischen 0,035 und 0,045  $\mu\text{g/L}$  CBZ gemessen. Diese Konzentrationen stiegen im Stadtgebiet durch den Eintrag der Klärwerke deutlich an. In der Spree wurden 600 m vor der Mündung in die Havel im Median 0,19  $\mu\text{g/L}$  CBZ gefunden (161). Nach Zusammenfluss von Havel und Spree betrug die Konzentration im Median 0,27  $\mu\text{g/L}$  (Messstelle 325). Die höchsten Konzentrationen wurden mit 0,86  $\mu\text{g/L}$  (Median) bzw. 1,9  $\mu\text{g/L}$  (Maximum) im Teltowkanal gemessen (Messstelle 430). Ein Teil des belasteten Wassers des Teltowkanals fließt in den Großen Wannsee, wo im Median 0,38  $\mu\text{g/L}$  CBZ gemessen wurden (Messstelle 350).

#### *Grund- und Trinkwasser*

In Berlin werden 100 % des Trinkwassers aus Grundwasser gewonnen. Da der Trinkwasserbedarf die natürliche Grundwasserneubildung übersteigt, wird ein Großteil (ca. 70 %) des entnommenen Trinkwassers durch Uferfiltration oder künstliche Grundwasseranreicherung gewonnen [147]. Bei der Uferfiltration wird das Wasser aus Brunnen gewonnen, die sich in relativ geringen Abständen von wenigstens 600 m von Oberflächengewässern befinden [148]. Durch eine kontinuierliche Wasserentnahme wird das entnommene Wasser überwiegend aus dem benachbarten Gewässer gespeist. Uferfiltration findet vor allem in der Umgebung des Tegeler Sees, des Großen Müggelsees und des Wannsees statt. Da der Tegeler See durch den Eintrag des Klärwerks Schönerlinde besonders hohe CBZ-Konzentrationen führt, wurde in einer Studie aus den Jahren 2000-2002 im Wasserwerk Tegel besonders hohe CBZ-Konzentrationen gefunden [133]. Hier wurden im Durchschnitt 90 ng/L mit einem Spitzenwert von 140 ng/L gemessen. Geringer belastet war das Wasserwerk Beelitzhof (Wannsee) mit beständig gemessenen 10-30 ng/L. In allen anderen Wasserwerken konnte CBZ gar nicht oder nur vereinzelt in geringen Mengen nachgewiesen werden.

### 2.2.3 Abbau im Klärwerk

Die sechs Berliner Klärwerke werden wie 95 % aller deutschen Klärwerke [149] mit zwei oder mehr Reinigungsstufen betrieben. In einem Absetzbecken werden zunächst feste Stoffe wie Sand, Papier und Abfall sowie flüssige Bestandteile wie Öl und Fett mechanisch von Boden und Wasseroberfläche entfernt. In der nachfolgenden biologischen Reinigungsstufe werden mit Hilfe von im Klärschlamm enthaltenen Mikroorganismen zum einen Ammonium, Nitrat und Phosphat entfernt. Die Entfernung dieser Ionen ist von entscheidender Bedeutung für die Gewässergüte, da auf diese Weise der Eutrophierung entgegengewirkt wird. Als dritte Reinigungsstufe schließt sich die chemische Reinigung an, die wegen der höheren Betriebskosten in vielen Klärwerken nur bei Bedarf zugeschaltet wird. Hierunter fällt zum Beispiel die Fällung von Phosphat mit Hilfe von Kalk oder Eisensalzen.

Von den Bakterien im Klärschlamm werden darüber hinaus viele gelöste organische Spurenstoffe aufgenommen und teilweise metabolisiert. Von Bedeutung ist die Adsorption an die Zellwand, die vorwiegend durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Zellwand erfolgt. Diese Adsorption ist bei Stoffen mit einem  $\log K_{ow}$  oberhalb von 4.0 nennenswert, während ein  $\log K_{ow}$  unterhalb von 2,5 nur zu einem geringen Adsorptionsgrad führt [150].

Der metabolische Abbau in der Zelle ist schwer vorhersagbar und hängt neben der Bioverfügbarkeit von der chemischen Struktur ab. Beispielsweise bestehen zwischen den strukturell sehr ähnlichen Hormonen 17 $\beta$ -Estradiol (E2) und 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE2) deutliche Unterschiede in der biologischen Abbaubarkeit. Während E2 bakteriell schnell abgebaut wird, ist EE2 deutlich langlebiger [151]. Ein anderes Beispiel für einen großen Einfluss der chemischen Struktur auf die Abbaubarkeit im Klärwerk ist Naphtalindisulfonat, das wesentlich schlechter abbaubar ist als das Monosulfonat [152].

Daneben können im Klärwerk auch abiotische Abbauprozesse stattfinden, die gegenüber dem biotischen Abbau in der Regel eine untergeordnete Rolle spielen [153]. Hierzu zählen chemische und physikalische Prozesse wie Hydrolyse, Oxidation und Photolyse.

Aufgrund der mäßigen Lipophilie von CBZ ( $\log K_{ow} = 2,45$  [154]) findet nur eine unzureichende Adsorption von CBZ an Klärschlamm statt. Für CBZ wurde der Verteilungskoeffizient zwischen Sekundärschlamm und Wasser mit 1,2 L/kg bestimmt und lag damit deutlich unter dem Wert von 500 L/kg, der für eine erfolgreiche Reinigungsleistung ungefähr erforderlich ist [155]. Die Untersuchung von Klärschlamm erbrachte auch nur vergleichsweise kleine Mengen an adsorbiertem CBZ im Bereich von 11 bis 123  $\mu\text{g/kg}$  [156-159]. Aufgrund dieser geringen Adsorption wurde nur in wenigen Klärwerken eine nennenswerte Eliminierung von bestenfalls 30-50 % gefunden [160, 161]. Die meisten Untersuchungen ergaben CBZ-Abbauraten von weniger als 10 % [6, 161-163]. In mehreren Fällen wurde während der Klärwerkspassage sogar ein Konzentrationsanstieg beobachtet [25, 164-167]. Die Reinigungsleistung des Klärschlammes beruht nicht alleine auf der Adsorption von CBZ, sondern in geringem Umfang auch auf einem Abbau zu Acridin und Acridon [168].

Möglicherweise handelt es sich bei der Substanz 9-Methylacridin um ein Abbauprodukt von CBZ. Diese Substanz ist wiederholt im Ablauf von Klärwerken, nicht aber im Zulauf gefunden worden [169, 170]. Es ist bekannt, dass CBZ unter stark sauren und oxidierenden

Bedingungen zu 9-Methylacridin zerfallen kann [171, 172]. Außerdem kann der CBZ-Metabolit Iminostilben durch Ringverkürzung zu 9-Methylacridin reagieren [173].

#### *Schicksal der Metaboliten im Klärwerk*

Mit den menschlichen Ausscheidungen gelangen auch zahlreiche Metaboliten von CBZ ins Abwasser (s. Kapitel 2.1.3). Das Vorkommen dieser Metaboliten im Abwasser wurde bislang nur vereinzelt untersucht (s. Tabelle 6). Die untersuchten Metaboliten zeigten im Klärwerk eine ähnlich geringe Abbaurate wie CBZ.

Interessant ist ein Blick auf die Konzentrationsverhältnisse zwischen Metaboliten und CBZ. Die Konzentration des Hauptmetaboliten DiOH-CBZ lag im Urin etwa 20- bis 30-fach höher als diejenige von CBZ (s. Tabelle 1). In allen untersuchten Abwässern und auch in Oberflächengewässern [174-176] lag die Konzentration an DiOH-CBZ jedoch nur um den Faktor 1,5 bis 3 höher als die von CBZ. Ähnliche Diskrepanzen waren auch bei EP-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ zu beobachten. Dies spricht dafür, dass bei Ankunft im Klärwerk neben der mit dem Urin ausgeschiedenen Dosis auch der größte Teil des mit dem Kot ausgeschiedenen CBZ im Abwasser gelöst vorlag. Mehr als 90 % des nicht metabolisierten CBZ werden über den Kot ausgeschieden. Bei Berücksichtigung dieses Anteils stimmen die Konzentrationsverhältnisse im Abwasser und in den menschlichen Ausscheidungen für alle Metaboliten in hohem Maße überein. Das im Abwasser gefundene CBZ ist demnach größtenteils durch menschliche Ausscheidungen dorthin gelangt. Ein alternativer Erklärungsansatz ist, dass die fehlende Menge an CBZ durch die unsachgemäße Entsorgung von nicht mehr benötigten Tabletten über die Toilette [13] zu erklären ist. Diese Hypothese erscheint wenig wahrscheinlich, da hierzu konstant mehr als 10 % der konsumierten Menge über die Toilette entsorgt werden müsste.

Auffällig ist die hohe Konzentration an 10-OH-CBZ in französischem Abwasser. Dies ist vermutlich auf eine höhere Verbreitung von Ox-CBZ in Frankreich zurückzuführen. Dieser Wirkstoff wird im menschlichen Metabolismus zu etwa 80 % zu 10-OH-CBZ umgewandelt [177] und wurde in derselben Studie ebenfalls im Abwasser nachgewiesen. Da 10-OH-CBZ pharmakologisch ähnlich wirksam ist wie CBZ, ist dieser Befund möglicherweise relevant für die Beurteilung der Gewässergüte.

Dürftig ist die Datenlage hinsichtlich der Verbreitung der Metaboliten 1-OH-CBZ und HCA, die jeweils ca. 5 % der eingenommenen Dosis ausmachen und damit zu den bedeutenderen Metaboliten zählen. Letzterer wurde einzig in Frankreich nachgewiesen, konnte jedoch mangels eines Kalibrierstandards nicht quantifiziert werden.

Tabelle 6: Konzentrationen von CBZ und Metaboliten in Abwässern. Mittelwerte aus *n* Messwerten, alle Angaben in µg/L. Nur Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze wurden herangezogen.

Land	Matrix	n	CBZ	DiOH-CBZ	2-OH-CBZ	3-OH-CBZ	EP-CBZ	10-OH-CBZ	Referenz
Deutschland	Zulauf	1	2	3,7					[174]
	Ablauf	1	1,9	3,6					[174]
Kanada	Zulauf	3	0,42	1,26	0,09	0,075	0,043	0,015	[158, 175, 178]
	Ablauf	3	0,38	1,25	0,10	0,086	0,036	0,021	[158, 175, 178]
Frankreich*	Zulauf	3	0,29	0,690	0,037		0,026	1,07	[179]
	Ablauf	3	0,17	0,90	0,037		0,021	1,11	[179]
Schweiz	Zulauf	9	1,12	1,96					[176]
	Ablauf	9	0,98	2,06					[176]
Norwegen	Ablauf	2	0,34				0,097		[180]

\* darüber hinaus wurden Acridin, Acridon, HCA und Ox-CBZ nachgewiesen

#### *Schicksal der Glucuronide im Klärwerk*

Wie erwähnt wurde in zahlreichen Studien ein Anstieg des CBZ-Gehalts während der Klärwerkspassage beobachtet. Dieser Konzentrationsanstieg lässt sich auf den Abbau von CBZ-N-Glucuronid zurückführen, das von Vieno et al. im Rohabwasser, nicht jedoch im geklärtem Abwasser nachgewiesen werden konnte [166].

Dieser Abbau des N-Glucuronids setzt offenbar in einigen Fällen bereits vor Erreichen des Klärwerks ein. Clara et al. fanden beträchtliche Schwankungen der CBZ-Konzentration im Klärwerkszulauf bis zu einem Faktor von zwei, stellten hingegen eine vergleichsweise konstante Konzentration im Klärwerksablauf fest [25]. Die beobachtete Erhöhung der CBZ-Konzentration um bis zu 100 % passt zu den pharmakokinetischen Studien, nach denen etwa 12,5 % der eingenommenen Dosis unverändert und 11 % als CBZ-N-Glucuronid ausgeschieden werden (s. Kapitel 2.1.3). Eine vollständige Spaltung des Glucuronids würde also näherungsweise zu einer Verdoppelung der Konzentration führen. Eine ähnliche Verdoppelung der CBZ-Fracht bei der Klärwerkspassage wurde von Vieno et al. beobachtet [166].

Die Natur der N-Glucuronid-Spaltung ist bislang nicht geklärt worden. Eine  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität des Klärschlammes ist zwar belegt [181], CBZ-N-Glucuronid ist allerdings wie auch viele andere N-Glucuronide [182] nicht von  $\beta$ -Glucuronidase spaltbar [81]. Ein weiteres Beispiel für ein persistentes N-Glucuronid ist Lamotrigin-N-Glucuronid, das im Klärwerk nur teilweise abgebaut wird und infolgedessen in Oberflächengewässern nachweisbar ist [183].

Die O-Glucuronide im Rohabwasser sind dagegen deutlich leichter spaltbar. Viele CBZ-Metaboliten wie zum Beispiel 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ liegen im Urin fast vollständig als O-Glucuronid vor, sind bei Erreichen des Klärwerks hingegen bereits nahezu vollständig hydrolysiert (s. Tabelle 6). Auch blieben während der Klärwerkspassage die Konzentrationen der unkonjugierten Form annähernd unverändert. Diese Beobachtung deutet ebenfalls

darauf hin, dass die Konjugate bereits in der Kanalisation gespalten wurden. Für einige Hormone ist ebenfalls berichtet worden, dass die O-Glucuronide bereits vor Erreichen des Klärwerks hydrolysiert werden [184, 185]. Dieses Phänomen kann durch die Anwesenheit von *Escherichia-coli*-Bakterien im Abwasser erklärt werden. Dieser mit dem Kot ausgeschiedene Bakterienstamm produziert reichlich  $\beta$ -Glucuronidase und ist hierdurch in der Lage Glucuronide zu spalten [186].

#### *Fortschrittliche Reinigungsverfahren*

Da etliche organische Spurenstoffe nur unzureichend durch die Behandlung mit Klärschlamm entfernt werden können, wurden alternative Reinigungstechniken entwickelt.

Eine fast vollständige Elimination von CBZ ermöglicht die Behandlung des Abwassers mit Ozon [187-190]. CBZ wird dabei unter Öffnung des Rings zunächst in 10,11-Position oxidiert. Aus der peroxidierten Zwischenstufe bilden sich nachfolgend verschiedene Chinazolinderivate [188] unbekannter Toxizität.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der adsorptiven Entfernung mit Hilfe von Aktivkohle, die ebenfalls eine fast vollständige Entfernung von CBZ ermöglicht [191, 192]. Auch die photokatalytische Behandlung mit Titandioxid bringt hohe Abbauraten von CBZ [193], ähnlich wie die Reinigung durch Umkehrosmose [110, 192]. Wegen der hohen Betriebskosten hat bislang keines dieser Verfahren eine nennenswerte Bedeutung in Deutschland erlangt.

## 2.2.4 Abbau in der Umwelt

#### *Adsorption an Partikeln und Böden*

Durch Versickerung gelangt CBZ ins Erdreich und kann dort adsorbiert werden. Die Bodenretention hängt sehr stark von der Bodenart ab. In Vulkanböden erreicht der Adsorptionsgrad fast 100 %, während in Sandböden kaum messbare Adsorption stattfindet [194]. Auch ist die Adsorptionsfähigkeit des Bodens in größeren Tiefen aufgrund des geringen Anteils an organischer Materie im Boden geringer [195]. In europäischen Böden und Sedimenten wurde eine niedrige [31] bis moderate [196] Bodenretention ermittelt, so dass CBZ bis ins Grundwasser vordringen kann.

Der Metabolit DiOH-CBZ zeigte eine ähnlich hohe Persistenz wie CBZ, aber eine deutlich niedrigere Bodensorption [196], so dass ein Vordringen von DiOH-CBZ bis ins Grundwasser wahrscheinlich erscheint.

#### *Abbau durch Mikroorganismen*

Der Abbau von organischen Spurenstoffen durch Mikroorganismen ist im Labor schwierig zu ermitteln, da je nach Umgebung eine kaum zu überschauende Zahl verschiedener Organismen daran beteiligt sein kann. Zu erwähnen ist eine Mikrokosmos-Studie, bei der 15 Wassertanks von je 12 m<sup>3</sup> mit Fischen, Wasserpflanzen und einer Vielzahl an Kleinstlebewesen besiedelt wurden, um die aquatische Umwelt lebensgetreu nachzubilden. Hier wurde für CBZ eine sehr hohe Halbwertszeit von ca. 80 Tagen gefunden [197]. In einer

anderen Studie wurden Halbwertszeiten von mehr als 100 Tagen für den Abbau durch in Oberflächenwasser vorkommende Mikroorganismen berichtet [198].

Ebenfalls erwähnenswert sind mehrere Arbeiten zum Abbau von CBZ durch Pilze. Diese Studien haben weniger die Erforschung des Abbaus in der Umwelt als den möglichen Einsatz in Bioreaktoren für die Abwasserreinigung zum Ziel. Nichtsdestotrotz geben sie einen Einblick in mögliche Abbauewege in der Umwelt.

Besonders effizient geschah der Abbau von CBZ durch den Schimmelpilz *Pleurotus ostreatus*, bei dem innerhalb von 10 Tagen ein 99%iger Abbau einer 10 mg/L-Lösung gelang [199]. Das Enzym Cytochrom P450 spielte dabei ähnlich wie im menschlichen Metabolismus eine entscheidende Rolle [199]. Wie beim Menschen entstanden dabei hauptsächlich die Abbauprodukte DiOH-CBZ, EP-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ.

Die Pilzkulturen *Cunninghamella elegans*, *Umbelopsis ramanniana*, *Trametes versicolor* und *Ganoderma lucidum* waren ebenfalls in der Lage CBZ abzubauen. Hier fand allerdings ein wesentlich langsamerer Abbau mit Halbwertszeiten von 7 bis über 25 Tagen statt [200-202].

#### *Photolytischer Abbau*

Zum photolytischen Abbau von CBZ in der Umwelt sind verschiedene Untersuchungen durchgeführt worden. Andreozzi et al. simulierten die Lichtverhältnisse in europäischen Breitengraden und errechneten eine Halbwertszeit von etwa 100 Tagen [203]. Diese Messung ist jedoch möglicherweise fehlerbehaftet, da hierbei die UV-Absorption der verwendeten Glasküvetten nicht berücksichtigt wurde. In neueren Studien wurden je nach Testbedingungen wesentlich kürzere Halbwertszeiten von 3 bis 122 Stunden ermittelt [204-206]. Übereinstimmend wurde berichtet, dass die Zusammensetzung des Wassers einen großen Einfluss auf den Abbau hat. So fördern ein hoher Anteil an gelöstem organischen Kohlenstoff [207], ein erhöhter Chloridgehalt [208] oder ein niedriger pH-Wert [205] den photolytischen Abbau von CBZ. Beim photolytischen Abbau von CBZ bilden sich neben EP-CBZ vorwiegend Acridin und Acridin-Derivate [204, 205], die eine potentiell höhere ökotoxikologische Wirkung als CBZ haben.

### 2.2.5 Aufnahme von CBZ durch Pflanzen und Fische

In der Umwelt kann CBZ durch Organismen aufgenommen werden. In Fischen, die in der Nähe von Kläranlagen gefangen wurden, ist CBZ in Leber und Muskeln nachgewiesen worden [209]. In anderen Studien konnte in Fischen hingegen kein CBZ nachgewiesen werden [210, 211].

Die Aufnahme von CBZ durch Pflanzen ist insbesondere nach einer landwirtschaftlichen Bewässerung mit Abwasser zu erwarten. Diese Nutzungsform wird vor allem in trockenen Regionen der Erde eingesetzt und nimmt in einigen Regionen erhebliche Ausmaße an. In den USA werden zum Beispiel 70 % der Anbauflächen für die Artischockenproduktion überwiegend mit aufbereitetem Abwasser bewässert [212]. Diese Abwasserwiederverwendung wird unter anderem in Israel [213], Jordanien, Marokko und China [212], vereinzelt auch in Deutschland [214] betrieben. In Mexiko geschieht die Bewässerung zum Teil sogar mit ungeklärtem Rohabwasser [139]. Nach Bewirtschaftung der Anbauflächen mit

Abwasser bzw. CBZ-haltigem Urin ist CBZ in Gurken und Weidelgras nachgewiesen worden [215, 216].

Darüber hinaus kann CBZ durch die landwirtschaftliche Nutzung des Klärschlammes auf die Felder gelangen. Die Gesamtmenge an Klärschlamm, der in Deutschland 2008 zur landwirtschaftlichen Düngung verwendet wurde, betrug etwa 600 000 t [217]. Da Klärschlamm nur wenig CBZ im  $\mu\text{g/kg}$ -Bereich adsorbiert (s. Kapitel 2.2.3), dürfte die auf die Felder ausgebrachte Menge an CBZ insgesamt deutlich unter 100 kg liegen. Dies ist weniger als 0,2 % der jährlich verbrauchten Menge an CBZ.

## 2.2.6 Grenzwerte und gesetzliche Regulierungen

Der Gesetzgeber hat für CBZ wie für den überwiegenden Teil der Arzneimittel bislang keinen Grenzwert für Trinkwasser festgelegt. Stattdessen gilt der stoffklassenunabhängige gesundheitliche Orientierungswert (GOW) von 300 ng/L [218]. Dieser Orientierungswert wurde nicht toxikologisch begründet, sondern wurde mit Bezug auf das Minimierungsgebot der Trinkwasserverordnung als Vorsorgewert eingeführt. In der Trinkwasserverordnung von 2001 heißt es hierzu in §6 allgemein, dass „Konzentrationen von chemischen Stoffen, die das Wasser für den menschlichen Gebrauch verunreinigen oder seine Beschaffenheit nachteilig beeinflussen können, so niedrig gehalten werden (sollen), wie dies nach den allgemein anerkannten Regeln der Technik mit vertretbarem Aufwand unter Berücksichtigung der Umstände des Einzelfalles möglich ist“.

Auch in Abwässern und Oberflächengewässern existieren in Deutschland keine gesetzlichen Regularien für das Vorkommen von CBZ. Anlässlich der EU-Richtlinie 2008/105/EG über Umweltqualitätsnormen in der Wasserpolitik wurde am 26. Juli 2011 die Oberflächengewässerverordnung (OGewV) verabschiedet. Nachdem im ursprünglichen Entwurf des Bundeskabinetts vom 17. März 2011 für CBZ eine einzuhaltende Umweltqualitätsnorm von 0,5  $\mu\text{g/L}$  vorgesehen war, wurde dieser Grenzwert in der endgültigen Version ersatzlos gestrichen.

Darüber hinaus wurde der Einsatz von CBZ als anthropogener Marker diskutiert. Das Umweltbundesamt und das Institut für sozial-ökologische Forschung erörterten 2010 gemeinsam mit Teilnehmern aus Gesundheitswesen, Pharmaindustrie, Wasserwirtschaft, Universitäten, Behörden und Verbraucherschutzorganisationen Handlungsmöglichkeiten für die Verminderung des Eintrags von Humanarzneimitteln in den Wasserkreislauf. Dieses Gremium empfahl dem Gesetzgeber unter anderem die „Prüfung und gegebenenfalls Einführung eines einfachen und chemisch stabilen Indikatorparameters, der zuverlässig die Einhaltung des für alle nicht gentoxischen Humanarzneimittelrückstände in jeder Hinsicht gesundheitlich sicheren GOW anzeigt“ [219]. CBZ darf als ein aussichtsreicher Kandidat gelten, diesen Indikatorparameter darzustellen [220].

## 2.3 Stand der Technik: HPLC-MS/MS

Für die organische Spurenanalytik ist die Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Tandemmassenspektrometrie Mittel der Wahl. Durch die Kombination der chromatographischen Trennleistung mit der massenspektrometrischen Selektivität sind

Multi-Analyt-Methoden mit hoher Nachweisstärke möglich. Nach einer Anreicherung mit Festphasenextraktion werden bei der Bestimmung der Carbamazepin-Konzentration in Gewässern gewöhnlich Nachweisgrenzen (LOD) von 10 ng/L oder weniger erreicht [39, 174, 221, 222].

Eine der häufigsten Fehlerursachen bei der Quantifizierung mit HPLC-MS/MS sind sogenannte Matrixeffekte, die durch die Begleitstoffe in der zu analysierenden Probe hervorgerufen werden. Sie machen sich bei der massenspektrometrischen Detektion dadurch bemerkbar, dass in der Ionenquelle neben dem Zielanalyten weitere Stoffe ionisiert werden, die gleichzeitig mit dem Analyten die Trennsäule verlassen. Hierdurch kann die Ionenausbeute des Zielanalyten verändert werden. Die Ionenausbeute kann ebenfalls bei sehr hohen Analytkonzentrationen beeinträchtigt werden. Dieser Einfluss auf die Ionisation ist in der Regel nicht langanhaltend und besteht nur für die Dauer der Elution der verantwortlichen Substanz. Für einige Substanzen, wie z. B. Triethylamin, kann dieser Effekt auch über mehrere Messungen hinweg andauern [223].

Matrixeffekte können durch eine Reihe von Maßnahmen verringert werden. Bewährt hat sich der Zusatz einer konstanten Menge eines isotoopenmarkierten Zielanalyten (interner Standard) zu allen Proben und Kalibrierlösungen. Weicht die Zahl der detektierten Ionen des internen Standards in einer Probe ab, kann hierdurch der Matrixeffekt erkannt und zum großen Teil sogar korrigiert werden. Isotoopenmarkierte Standards sind allerdings nicht immer verfügbar und häufig mit hohen Kosten verbunden.

Ionensuppression kann auch durch eine saubere chromatographische Trennung verringert werden [224-226]. Eine weitere Methode, um Matrixeffekte zu verringern, ist eine möglichst hohe Verdünnung der Probe [227, 228]. Eine Reinigung der Probe, z.B. durch eine geeignete SPE-Prozedur, kann ebenfalls Matrixeffekte verringern [229, 230]. Hierbei ist zu beachten, dass die Anreicherung der Probe bei der Festphasenextraktion gleichzeitig die Ionisation negativ beeinflussen kann. Der bei der Extraktion erreichbare Anreicherungsfaktor kann daher durch die auftretenden Matrixeffekte begrenzt werden.

Als Alternative zur verbreiteten Electrospray-Ionisation (ESI) kommt darüber hinaus die chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) in Frage, die als weniger matrixanfällig gilt [231, 232]. Allerdings ist die Sensitivität bei dieser Technik häufig niedriger und auch bei dieser Ionisationstechnik können Ionensuppressionen auftreten [233, 234].

## 2.4 Immunochemische Methoden

### 2.4.1 Kompetitiver ELISA

Schon früh wurden die Bindungseigenschaften von Antikörpern für analytische Zwecke ausgenutzt. Arrhenius führte 1907 erste Arbeiten zur quantitativen immunochemischen Analyse durch [235]. Der Startschuss für die Anwendung auf breiter Ebene fiel 1959 mit der Entwicklung des Radioimmunoassays durch Yalow und Berson [236]. Die Verleihung des Nobelpreises für Medizin an Rosalyn Yalow 1977 unterstreicht die Bedeutung dieser Entdeckung. Ein wichtiger Durchbruch gelang mit der Einführung des Enzymlabels [237, 238]. Die nun ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) genannte Methode erreichte vor allem in der klinischen Diagnostik eine rasche Verbreitung.



Es existiert eine Vielzahl von immunchemischen Techniken für den Einsatz in der chemischen Analytik. An dieser Stelle soll nur die Funktionsweise des verwendeten kompetitiven ELISAs dargestellt werden, der in der Umweltanalytik besonders verbreitet ist [239, 240]. Für eine Übersicht weiterer immunchemischer Analysemethoden sei auf Reviews und Fachbücher verwiesen [241-243]. Unzählige ELISAs sind für die Gewässeranalytik entwickelt worden [244-246]. Eine Auswahl zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7: Auflistung einiger ELISAs, die für die Detektion von organischen Kontaminanten in Gewässern geeignet sind, k.A.: keine Angabe (kommerzielle Kits), SPE: Festphasenextraktion.

Analyt	Art des Antikörpers	Probenvorbereitung	LOD [ng/L]	Referenz
Atrazine	monoklonal	-	3-50	[247]
Diclofenac	polyklonal	-	6	[248, 249]
17- $\beta$ -Estradiol	polyklonal	-	2,5	[250]
Ethinylestradiol	polyklonal	-	0,2	[251]
Ethinylestradiol	polyklonal	SPE	0,01	[252]
Fenitrothion	polyklonal	-	300	[253]
Indomethacin	polyklonal	-	10	[254]
Koffein	monoklonal	-	1	[126]
Levonorgestrel	polyklonal	SPE	70	[255]
Monensin	polyklonal	Verdünnung	1500	[256]
Nitrofurantoin	polyklonal	-	200	[257]
Oxytetracyclin	k. A.	-	1000	[258]
Sulfonamide	polyklonal	-	40	[259]
Tetracyclin	k. A.	-	50	[260]
Tylosin	k. A.	-	100	[260]

#### Ablauf des ELISAs

Im ersten Schritt des ELISAs wird ein sogenannter sekundärer Antikörper auf die Mikrotiterplatte aufgetragen (s. Abbildung 7). Diese Immobilisierung an die Plattenoberfläche geschieht nicht durch kovalente Bindungen, sondern durch Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen [261]. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an ein Peptidsegment des nichtbindenden Teils des im nachfolgenden Schritt aufgetragenen primären Antikörpers. Der somit ebenfalls immobilisierte primäre Antikörper ist in der Lage, den zu untersuchenden Analyten selektiv zu binden.

Nach der Immobilisierung beider Antikörper auf der Plattenoberfläche werden nacheinander die zu untersuchende Probe und der Tracer<sup>1</sup> zugegeben. Der Tracer, ein Konjugat aus dem Analyten und einem signalgebenden Bestandteil (Label), sorgt für die Signalerzeugung. Beim ELISA werden als Label Enzyme eingesetzt, wobei sich besonders das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) als geeignet erwiesen hat [262].

<sup>1</sup>Die Verwendung des Begriffs Tracer (englisch: trace = Spur) geht auf die Radioimmunoassays zurück, für die ein oder mehrere Atome im Antigen durch radioaktive Isotope ersetzt wurden. Stattdessen werden heute meist Enzymkonjugate verwendet, die sich gefahrlos und ohne Beachtung von Strahlenschutzauflagen verwenden lassen.

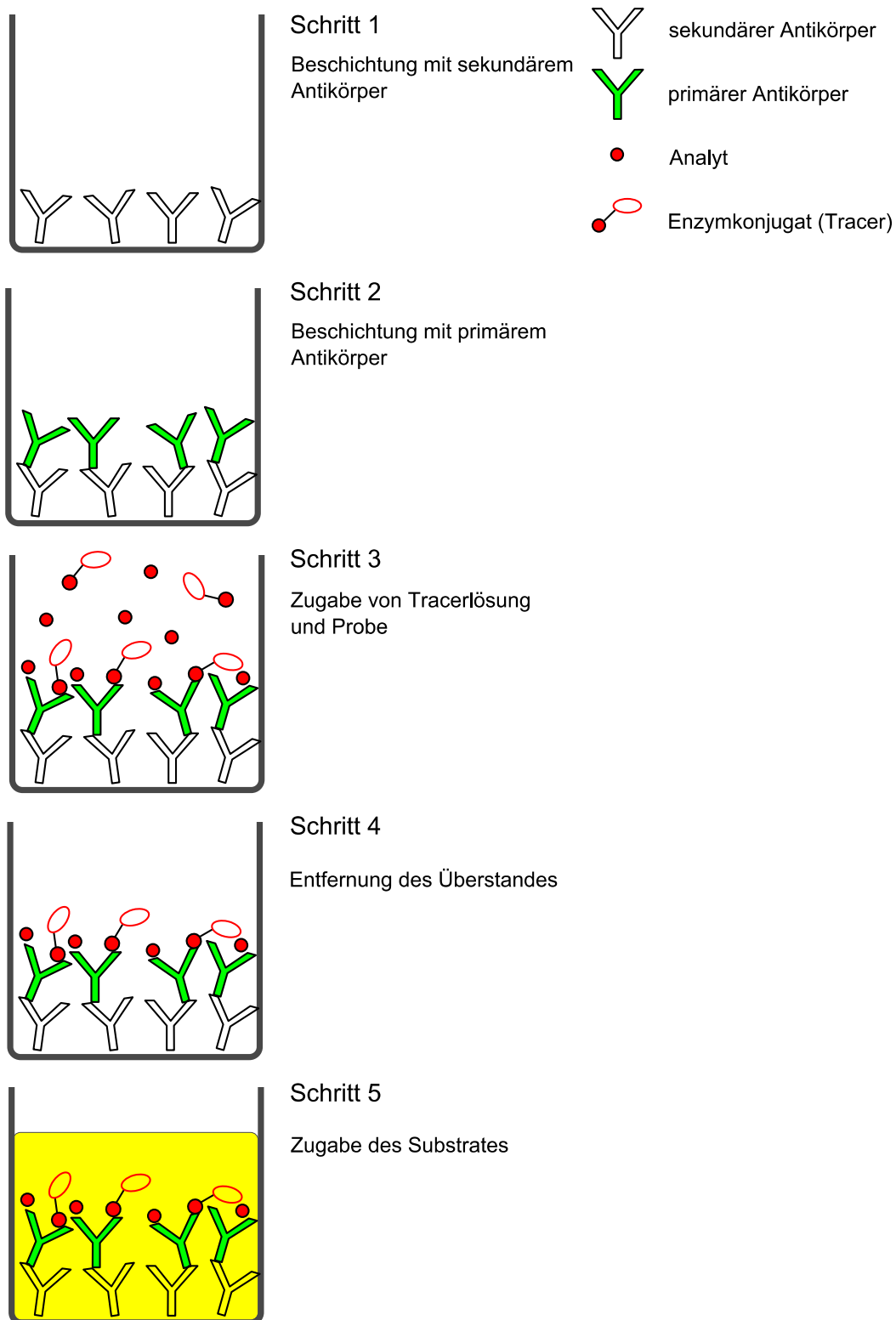


Abbildung 7: Schematischer Ablauf des kompetitiven ELISAs in fünf Schritten. Die Wände der Mikrotiterplatte sind als dunkelgrauer Kasten dargestellt. Zwischen jedem Schritt wird der Überstand entfernt und die Kavität mehrfach gespült.

In der Reaktionsmischung steht der in der Probe vorhandene Analyt mit dem Tracer in Konkurrenz um die freien Bindungsstellen des immobilisierten Antikörpers. Eine hohe Analytkonzentration in der Probe führt zu einer geringen Menge an gebundenem Tracer und umgekehrt. Nach einem Waschschrift wird ein geeignetes Substrat zugegeben, das zur Bildung eines Farbstoffs führt. Jedes Enzym kann dabei eine Vielzahl von Farbstoffmolekülen erzeugen. Hierdurch ist ein wesentlich stärkeres Signal möglich als beim direkten Einsatz eines Farbstoffs als Label. Beim Einsatz eines geeigneten Antikörpers sind ELISAs daher in der Regel sehr empfindlich.

## 2.4.2 Auswertung eines Immunoassays

Die Abhängigkeit zwischen der gemessenen Extinktion  $f(x)$  und der Analytkonzentration  $x$  im ELISA lässt sich mit der von Rodbard vorgeschlagenen sigmoidalen 4-Parameter-Formel beschreiben [263]:

$$f(x) = \frac{A - D}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} + D \quad (1)$$

Je weniger Analyt in der Probe enthalten ist, desto mehr Tracer bindet an die Bindungsstellen des Antikörpers. Die obere Asymptote (A-Wert) entspricht im idealen Fall dem Messsignal bei Abwesenheit des Analyten (s. Abbildung 8). Bei großem Überschuss an Analyten wird die Bindung des Tracers an den Antikörper weitgehend unterbunden, so dass bei hohen Analytkonzentrationen ebenfalls ein asymptotischer Kurvenverlauf vorliegt. Dieser D-Wert nimmt in der Praxis Werte oberhalb von Null an, da ein Teil des Tracers unspezifisch an die Plattenoberfläche adsorbiert. Der Wendepunkt der Kalibrierfunktion wird Testmittelpunkt (C-Wert) genannt, der Parameter B ist ein Maß für die Steigung am Testmittelpunkt.

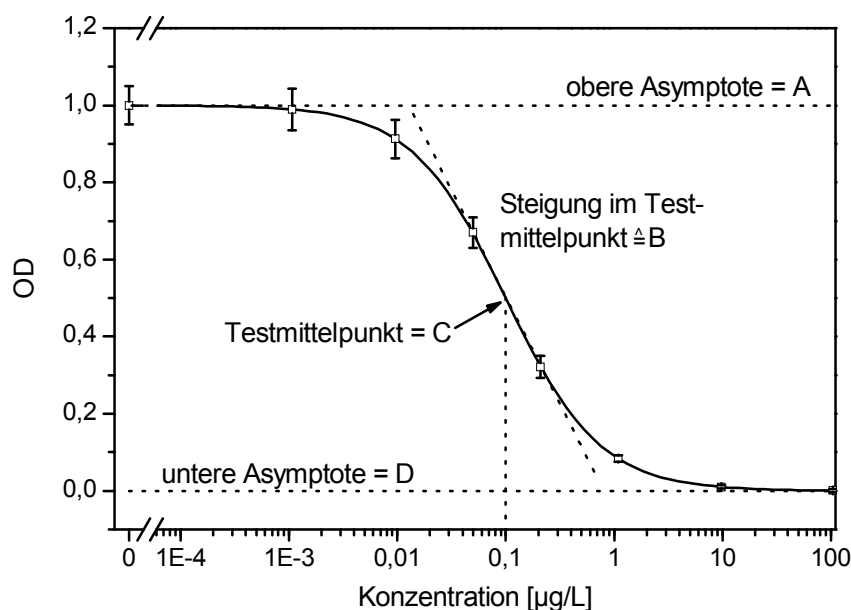


Abbildung 8: Kalibrierkurve eines ELISAs mit Veranschaulichung der vier Parameter der sigmoidalen Kalibrierfunktion nach Rodbard.

Nach der Kalibrierung kann die Analytkonzentration in einer Probe über die Messung der optischen Dichte bestimmt werden. Nach Umstellung von Gleichung (1) ergibt sich die Konzentration  $x$  in der Probe:

$$x = C \left( \frac{A - D}{f(x) - D} - 1 \right)^{\frac{1}{B}} \quad (2)$$

### *Nachweisgrenze*

Für analytische Methoden mit einer linearen Kalibrierkurve gilt laut ICH (International Conference on Harmonisation) folgende allgemeine Definition der Nachweisgrenze (LOD – Limit of Detection) [264]:

$$\mu \quad c(LOD) = 3,3 \frac{s}{a} \quad (3)$$

$s$ : Standardabweichung der Observablen

$a$ : Steigung der Kalibrierkurve

Diese Definition ähnelt der Definition der Nachweisgrenze nach DIN 32645, die hierfür die dreifache Standardabweichung („3s-Kriterium“) heranzieht. Für den sigmoidalen Kurvenverlauf im ELISA ist diese Definition nicht direkt anwendbar. Aus diesem Grund sind zahlreiche, teils willkürliche Methoden in Gebrauch, die Nachweisgrenze eines ELISAs zu bestimmen [265]. Tatsächlich kann die Definition nach Gleichung (3) in abgewandelter Form auch für den ELISA verwendet werden. Sie ist äquivalent mit der Forderung, dass die Konzentrationsbestimmung mit einer relativen Standardabweichung von maximal 30 % erfolgt [266]. Dieses Kriterium kann über das Präzisionsprofil nach Ekins überprüft werden [267].

### *Präzisionsprofil*

Das Präzisionsprofil beschreibt die Konzentrationsabhängigkeit der Präzision, mit der die Konzentration bestimmt werden kann. Die beim ELISA aus den Messungen der optischen Dichte erhaltene Standardabweichung  $s$  kann über eine lineare Approximation in die relative Standardabweichung der Konzentration  $\Delta x$  umgewandelt werden [267]:

$$\Delta x = \frac{s}{x \frac{df(x)}{dx}} \quad (4)$$

Diese Formel reicht im Prinzip aus, um experimentell die Konzentration zu bestimmen, bei der  $\Delta x$  einen Wert von 30 % annimmt.

Nach Ableitung der Funktion  $f(x)$  ergibt sich aus Gleichung (4):

$$\Delta x = \frac{s}{B(D - A)} \left[ \left( \frac{C}{x} \right)^B + 2 + \left( \frac{x}{C} \right)^B \right] \quad (5)$$

Hieraus lassen sich allgemeine Informationen über die Form und Lage des Präzisionsprofils entnehmen. Unter der sicher erfüllten Voraussetzung, dass  $s$  nicht beliebig klein werden kann, ergibt sich hieraus, dass  $\Delta x$  für  $x \rightarrow \infty$  und  $x \rightarrow 0$  gegen unendlich strebt. Aufgrund des beidseitig asymptotischen Verlaufs der Kalibrierkurve nimmt das Präzisionsprofil deshalb einen U-förmigen Verlauf an. Dies bedeutet, dass die Präzision sowohl bei sehr kleiner als auch bei sehr hoher Konzentration abnimmt. Daher existiert neben einer unteren auch eine obere Nachweisgrenze.

Für weitere Aussagen über das Präzisionsprofil sind Kenntnisse über die Konzentrationsabhängigkeit von  $s$  nötig. Einige interessante Schlussfolgerungen lassen sich ziehen, wenn man die Messunsicherheit der Extinktion näherungsweise als Summe zweier Teile begreift.

Zum einen sind die Anteile zur Messunsicherheit zu berücksichtigen, die bei der Signalerzeugung im ELISA entstehen. Die letztlich gemessene Signalintensität hängt von der Menge des Tracers ab, die während der Bindungsreaktion vom immobilisierten Antikörper gebunden wird. Hayashi et al. haben gezeigt, dass dieser Beitrag zur Messunsicherheit maßgeblich von der Präzision der Pipetten abhängt und letzten Endes proportional zur Messunsicherheit des Messsignals ist [266]. Dieser Beitrag lässt sich formulieren als Produkt aus relativer Messunsicherheit  $s_{\text{relativ}}$  und dem Messsignal  $f(x)$ .

Zum anderen sind die Anteile zu berücksichtigen, die unabhängig von der Bindungsreaktion zwischen Tracer und Antikörper sind. Diese Faktoren können als „Rauschen“ zusammengefasst werden. Hierzu zählen zum Beispiel die Messunsicherheit des Photometers sowie das Signal, das durch die unspezifische Bindung von Tracermolekülen an die Oberfläche der Mikrotiterplatte erzeugt wird.

Die gesamte Messunsicherheit  $s$  lässt sich demnach formulieren als Summe aus einem absoluten Anteil  $s_{\text{absolut}}$  und einem relativen Anteil, der proportional zum Messsignal  $f(x)$  ist:

$$s = s_{\text{absolut}} + s_{\text{relativ}} * f(x) \quad (6)$$

$s_{\text{relativ}}$  und  $s_{\text{absolut}}$  sind in der Praxis beide relevant und lassen sich näherungsweise abschätzen. Aufgrund des sigmoidalen Kurvenverlaufs von  $f(x)$  ist der zweite Teil dieses Terms,  $s_{\text{relativ}} * f(x)$ , bei kleinen Konzentrationen maximal, während er bei großen Konzentrationen gegen Null strebt.  $s_{\text{relativ}}$  entspricht näherungsweise der relativen Standardabweichung der optischen Dichte bei einer Analytkonzentration von Null, während  $s_{\text{absolut}}$  der Standardabweichung bei einer unendlichen Analytkonzentration entspricht.

Nach Einsetzen von Gleichung (6) in Gleichung (5) ergibt sich für den relativen Fehler der Konzentration  $\Delta x$ :

$$\Delta x = \frac{s_{\text{absolut}} + s_{\text{relativ}} \left[ \frac{A-D}{(1 + \left(\frac{C}{C_0}\right)^B)} + D \right]}{B(D-A)} \left[ \left(\frac{C}{x}\right)^B + 2 + \left(\frac{x}{C}\right)^B \right] \quad (7)$$

Die grün markierten Terme sind bei niedrigen Konzentrationen vernachlässigbar klein, während dies für den gelb markierten Term bei hohen Konzentrationen zutrifft.

Mit Hilfe dieser Formel lassen sich Präzisionsprofile bei beliebigen Werten für  $s_{\text{absolut}}$  und  $s_{\text{relativ}}$  simulieren. Abbildung 9a zeigt anschaulich, dass eine Reduktion des relativen Fehlers  $s_{\text{relativ}}$  bei gleichbleibendem  $s_{\text{absolut}}$  die Präzision der Konzentrationsbestimmung bei niedrigen Konzentrationen verbessert, während sie bei hohen Konzentrationen annähernd identisch bleibt. Umgekehrt zeigt eine Verringerung von  $s_{\text{absolut}}$  bei gleichbleibendem  $s_{\text{relativ}}$  im Wesentlichen nur Auswirkungen bei hohen Konzentrationen (s. Abbildung 9b).

Für die Praxis bedeutet dies, dass die untere Nachweisgrenze wesentlich von der Pipettiergenauigkeit abhängt. Auf der anderen Seite kann die obere Nachweisgrenze nicht wesentlich durch eine bessere Pipettiergenauigkeit verbessert werden. Hierfür sind vielmehr absolute Unsicherheitsbeiträge wie die unspezifische Bindung des Tracers an die Plattenoberfläche oder die Detektorgenauigkeit von Belang.

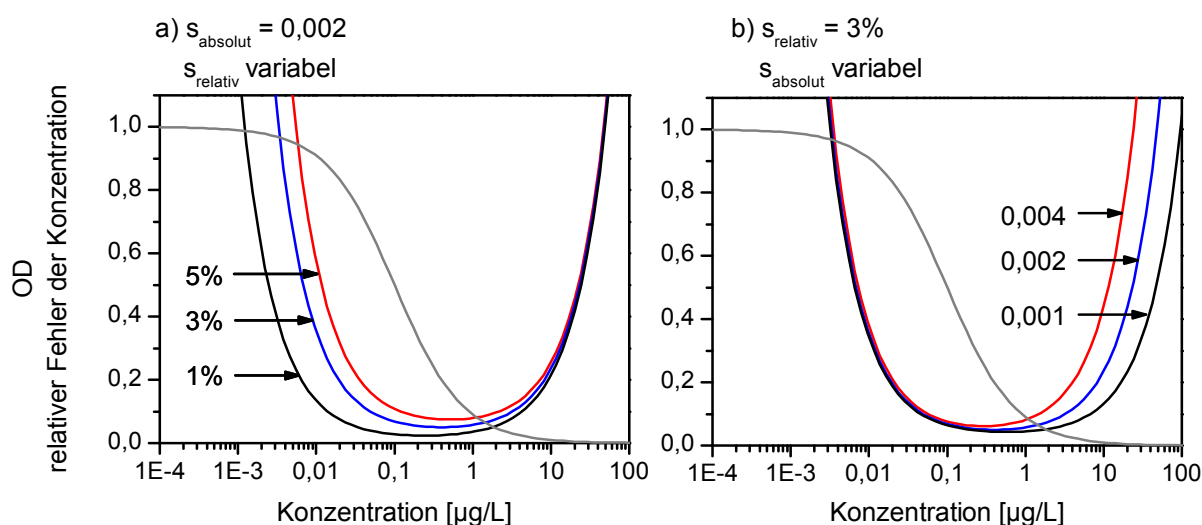


Abbildung 9: Form und Lage des Präzisionsprofils bei simulierter Standardabweichung der Absorption als Summe aus absoluter Standardabweichung  $s_{\text{absolut}}$  und Standardabweichung relativ zur OD ( $s_{\text{relativ}}$ ). a) bei einem absoluten Fehler von 0,002 und relativem Fehler von 1 %, 3 %, 5 %; b) bei einem relativen Fehler von 3 % und absolutem Fehler von 0,001; 0,002 und 0,004. Die zugehörige Kalibrierkurve ist grau dargestellt, mit  $A = 1$ ;  $B = 1$ ;  $C = 0,1$  und  $D = 0$ .

### 2.4.3 Selektivität und Kreuzreaktionen

Ein entscheidendes Qualitätskriterium eines Antikörpers ist seine Selektivität. Viele Antikörper binden nicht nur an den Zielanalyten, sondern zeigen Kreuzreaktionen mit anderen, strukturverwandten Molekülen.

Die Selektivität eines Antikörpers kann über die Bestimmung der Kreuzreaktivität gegenüber diesen Molekülen ermittelt werden. Zur Bestimmung dieser Kreuzreaktivität existieren mehrere Verfahren [268], von denen das von Abraham vorgeschlagene Verfahren [269] am verbreitetsten sein dürfte. Die Kreuzreaktivität CR berechnet sich dabei aus dem Verhältnis der Testmittelpunkte des Analyten ( $C_{\text{Analyt}}$ ) und des Kreuzreaktanden ( $C_{\text{Kreuzreaktand}}$ ):

$$CR = \frac{C_{\text{Analyt}}}{C_{\text{Kreuzreaktand}}} \quad (8)$$

Kreuzreaktivitätswerte sind keine Konstanten, sondern hängen von den Reaktionsbedingungen ab, in der die Bindung zwischen Antigen und Antikörper stattfindet. Generell ist jede Komponente, die einen Einfluss auf diese Bindung hat, dazu geeignet, auch die Kreuzreaktionen des Antikörpers zu beeinflussen. So kann neben dem Format des ELISAs [270] auch der pH-Wert des Reaktionsmediums [271] die Höhe der Kreuzreaktivitäten verändern.

Kontroverse Ergebnisse sind über den Einfluss der Inkubationszeit der Ligandenbindung berichtet worden. Bei einem polyklonalen Atrazin-ELISA führte die Verkürzung der Tracerinkubationszeit von zwei Stunden auf drei Minuten zu veränderten Kreuzreaktivitäten, wobei der Einfluss moderat war und sowohl erhöhte als auch verringerte Kreuzreaktivitäten beobachtet wurden [271]. In derselben Untersuchung führten theoretische Erwägungen zu dem Schluss, dass der Einfluss der Inkubationszeit von der Affinität des Antikörpers abhinge und besonders bei der Verwendung hochaffiner Antikörper eine kurze Inkubationszeit geringere Interferenzen durch Kreuzreaktanden verspräche. Andere Autoren berichteten hingegen, die Kreuzreaktivität nehme bei längeren Inkubationszeiten ab [272-275].

Bei der Antikörper-Antigen-Bindung im ELISA spielen sowohl das Reaktionsgleichgewicht als auch kinetische Aspekte eine Rolle [276]. Aus diesem Grund können auch die Kreuzreaktivitäten mit der Temperatur variieren [275]. Von Vining et al. wurde zum Beispiel von einem Steroid-Immunoassay berichtet, bei dem eine Temperaturerhöhung von 4°C auf 25°C oder 37°C zu einer Erhöhung der Kreuzreaktivität strukturähnlicher Steroide um 20 % bzw. 50 % führte [272].

Das von Abraham vorgeschlagene Verfahren zur Berechnung der Kreuzreaktivität reicht aus, um die Selektivität eines Antikörpers qualitativ zu beurteilen. Dieses Verfahren liefert aber nicht die Genauigkeit, die für den in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Dual-Analyt-Assay nötig ist (s. Kapitel 4.5.2). Eine Schwäche dieses Verfahren ist, dass für eine Konvergenz der Regressionsprozedur der komplette Kurvenverlauf abgebildet werden muss und dazu die Kalibrierpunkte über einen weiten Konzentrationsbereich verteilt werden müssen. Messfehler bei den für die Konvergenz nötigen Ankerpunkten [277] bei sehr hohen und sehr niedrigen Konzentrationen können aufgrund ihrer Lage eine erhebliche Hebelwirkung entfalten und die Bestimmung des Testmittelpunktes negativ beeinflussen. Erfahrungsgemäß ist die Bestimmung der Testmittelpunkte deshalb mit einem erheblichen Fehler belastet, der sich bei der Berechnung der Kreuzreaktivität als Quotient aus zwei Testmittelpunkten auch noch in ungünstiger Weise fortpflanzt.

Besser geeignet ist eine alternative Methode zur Bestimmung der Kreuzreaktivität, die ohne diese Ankerpunkte auskommt. Nach einer Methode, die von Miller und Valdes als „Equal Displacement Method“ bezeichnet wurde, ergibt sich die Kreuzreaktivität als Quotient aus der scheinbaren Analytkonzentration  $c_{\text{ELISA}}$  und der tatsächlich vorliegenden Konzentration  $c_{\text{Kreuzreaktand}}$  [278]:

$$\text{CR} = c_{\text{ELISA}} / c_{\text{Kreuzreaktand}} \quad (9)$$

$c_{\text{ELISA}}$  ist die mit dem ELISA bestimmte Äquivalentkonzentration des Kreuzreaktanden, die nach einer Kalibrierung mit dem Zielanalyten bestimmt wurde. Für eine Bestimmung der Kreuzreaktivität reicht es also aus, die ELISA-Äquivalentkonzentration bei einigen

geeigneten Konzentrationen des Kreuzreaktanden zu ermitteln. Die Kreuzreaktivität ergibt sich als Mittelwert der entsprechenden Quotienten aus Gleichung (9). Weder für den Zielanalyten noch für den Kreuzreaktanden ist die fehleranfällige Bestimmung des Testmittelpunktes erforderlich. Auf Ankerpunkte kann vollständig verzichtet werden, so dass der begrenzte Platz auf der Mikrotiterplatte besser ausgenutzt werden kann, um den quasi-linearen Kurvenbereich zwischen den beiden Asymptoten abzubilden.

Für den idealen Fall, dass die Kalibrierkurven von Zielanalyt und Kreuzreaktand vollständig parallel verlaufen, liefern Gleichung (8) und (9) identische Ergebnisse. Bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern wie beim CBZ-ELISA ist dies in der Regel der Fall. Nicht-Parallelität tritt gewöhnlich nur bei polyklonalen Antikörpern auf und ist mit dem Vorhandensein mehrerer Antikörperspezies mit unterschiedlicher Selektivität erklärbar [268].



## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Chemikalien

Für die Herstellung von Kalibrierlösungen wurden zunächst Stammlösungen der Konzentration 1 g/L angesetzt. Bis auf zwei Ausnahmen wurden alle Reagenzien in Methanol gelöst: Cetirizin, das mit Methanol innerhalb weniger Tage zum Methylester reagiert [279], und Opipramol, das eine geringe Löslichkeit in Methanol aufweist, wurden in Wasser gelöst. Reinstwasser wurde durch ein Wasseraufbereitungssystem der Marke Milli-Q hergestellt (MilliQ Synthesis A10, Millipore, Schwalbach).

Fluka, Aldrich, Sigma sind Marken der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland. Der Hersteller Toronto Research Chemicals mit Sitz in North York, Kanada wird im Folgenden mit TRC abgekürzt. Riedel-de-Haën ist eine Marke der Honeywell Specialty Chemicals GmbH mit Firmensitz in Seelze.

Wenn nicht anders gekennzeichnet, befindet sich der Firmensitz des Herstellers in Deutschland.

#### Proteine und Antikörper

Substanz	Hersteller
Casein, 96 %, Natriumsalz, Kat. Nr. C 8654, Lot 045K0159	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA), 98 %, Kat. Nr. A7906	Sigma-Aldrich
Meerrettichperoxidase EIA grade	Roche, Mannheim
Monoklonaler Antikörper gegen CBZ (Maus IgG 1, Kat. Nr. G31234M, Klon B3212M, Lot 5K32007)	BIODESIGN (Meridian Life Science Inc.), Saco, USA
Monoklonaler Antikörper gegen CBZ (Maus IgG 1, Kat. Nr. 12-6073, Lot 05010)	American Research Products, Belmont, USA
Polyklonaler Antikörper gegen Maus IgG F(c) Fragment (Ziege, Kat. Nr. R1612P, Lot 20185, affinitätsaufgereingt)	Acris Antibodies, Herford
Polyklonaler Antikörper gegen Maus IgG H&L Fragment (Schaf, Kat. Nr. R1256P, Lot 20243, affinitätsaufgereingt)	Acris Antibodies
Polyklonaler Antikörper gegen Maus IgG H&L Fragment (Kaninchen, Kat. Nr. R1253P, affinitätsaufgereingt)	Acris Antibodies
Polyklonaler Antikörper gegen Maus IgG (Ziege, Kat. Nr. M5899, Lot. 27H4855, Serum)	Sigma-Aldrich

## Chemikalien

Substanz, Reinheit	Hersteller
(R)-Cetirizin Dihydrochlorid, 98 %	TRC
(S)-Cetirizin Dihydrochlorid, 98 %	TRC
10,11-Dihydro-10,11-epoxycarbamazepin, 98 %	Sigma
10,11-Dihydro-10-hydroxycarbamazepin, 98 %	TRC
10,11-Dihydrocarbamazepin, 99 %	Aldrich
10,11-Dihydro- <i>trans</i> -10,11-dihydroxycarbamazepin, 98 %	TRC
<sup>13</sup> C- <sup>15</sup> N-Carbamazepin chem. 99 %, iso 99 % C, 98 % N	Campro Scientific, Berlin
2-Hydroxycarbamazepin, 98 %	TRC
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, research grade	Serva, Heidelberg
3-Hydroxycarbamazepin, 98 %	TRC
4-Chlorobenzhydrol, 98 %	Aldrich
4-Chlorobenzhydrolamin Hydrochlorid, 98 %	Sigma
Acetonitril, HPLC gradient grade	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Acridin, 98 %	ABCR GmbH, Karlsruhe
Amitriptylin, 98 %	Sigma
Ammoniumacetat, puriss, p.a., for LC-MS	Fluka
Benzhydrol, 99 %	Aldrich
Benzhydrolamin, 97 %	Aldrich
Carbamazepin, 99 %	Sigma
Carbamazepin-d <sub>2</sub> , 98 %	TRC
Cetirizin Dihydrochlorid, >98 %	Sigma
Cetirizin-d8, Dihydrochlorid, Chem 98 %, Iso 99 % D	TRC
Cloperastin Hydrochlorid, 98 %	Sigma
Dibenz[b,f]azepin (Iminostilben), 97 %	Aldrich
Dibenz[b,f]azepin-5-carbonyl chlorid, 95 %	Sigma
Diethylether, 99,9 % puriss.	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat, wasserfrei, 99 % ultra	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, 99 % ultra	Fluka
Dinatriumtetraborat, 98 %	Merck, Darmstadt
Diphenamid, 99,9 %	Fluka
Diphenhydramin Hydrochlorid, 98 %	Sigma
Diphenylamin, 99 %	Fluka
Doxepin Hydrochlorid, 98 %	Sigma
Ethanol 99,5 %	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (Na <sub>2</sub> EDTA), puriss.	Sigma-Aldrich
Fenarimol, 99 %	Fluka
Glycin, 99,7 %	Merck
Guardian™ Peroxidase Conjugate Stabilizer/Diluent (Kat.Nr. 37548)	Pierce (Thermo Scientific, Schwerte)
Hydroxyzin Dihydrochlorid, >98 %	Sigma
Imipramin Hydrochlorid, 99 %	Sigma
Kaliumchlorid p.a.	Merck
Kaliumdihydrogencitrat, Ultra, 99 %	Fluka

Substanz, Reinheit	Hersteller
Kaliumdihydrogenphosphat, Ultra, 95 %	Fluka
Loratadin, 98 %	Sigma
Magnesiumchlorid p.a.	Merck
Methanol, HPLC gradient grade	Mallinckrodt Baker
N-(Diphenylmethyl)-methylamin, 98 %	Aldrich
N,N'-Dimethylacetamid wasserfrei, puriss. absolut, 99,5 %	Fluka
N,N'-Dimethylformamid wasserfrei, puriss., absolut, 99,5 %	Fluka
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, 99 %, Kat# D80002	Aldrich
N,N'-Disuccinimidylcarbonat, purum 99,5 %	Fluka
N,N'-Diisopropylcarbodiimid, 99 %	Sigma
Natriumazid, reinst	Riedel-de Haën
Natriumcarbonat wasserfrei, Ultra, 99,5 %	Fluka
Natriumchlorid, Ultra, 99,5 %	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat, Ultra, 99 %	Fluka
Natriumhydrogencarbonat, Ultra, 99,5 %	Fluka
Natriumhydroxid, p.a.	Merck
Natriumhydroxid pellets, p.a.	Merck
N-Hydroxysuccinimid, 97,5 %, Kat# H-7377	Sigma
Norchlorcyclizin, >90 %, technical grade	Aldrich
Opipramol Dihydrochlorid, 98 %	Sigma
Oxcarbazepin, 98 %	Sigma
Phosphorsäure, 85 %	Sigma-Aldrich
Polyvinylalkohol, Molmasse 9000-10000 g/mol, 80 % hydrolisiert	Aldrich
Protriptylin Hydrochlorid, 99 %	Sigma
Salzsäure, 32 %, "Baker analyzed grade"	Mallinckrodt Baker
Schwefelsäure, 95-97 %, p.a., J. T. Baker	Mallinckrodt Baker
Sorbinsäure Kaliumsalz, p.a. 99 %	Merck
Tetrabutylammoniumborhydrid purum, 98 %,	Fluka
Tetrahydrofuran, puriss, absolut	Fluka
Trehalose Dihydrat, 97 %	Artimmun Analytik GmbH, Kelkheim
Triglycin, 99 %	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, p.a.	Merck
Tween <sup>TM</sup> 20, pure	Serva
Wasserstoffperoxid 30 %ige Lösung, p.a. "TraceSelect"	Fluka
Xusal-Lösung ((R)-Cetirizin Dihydrochlorid, 5 g/L)	UCB Pharma, Monheim

## 3.2 Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Puffer in Reinstwasser hergestellt (Tabelle 8). Der pH-Wert wurde mit 6 M Salzsäure oder 6 M Natronlauge eingestellt. Für die Optimierung des ELISA-Puffers (Kapitel 4.3.6) wurden acht verschiedene Probenpuffer verglichen. Für die Herstellung der Puffer bei pH 3,5; 4,5 und 5,5 wurde 1 M Kaliumdihydrogencitrat verwendet, für pH 6,5 1 M Kaliumphosphat, für pH 7,5 und 8,5 1 M TRIS und für pH 9,5 und pH 10,5 1 M Glycin. Alle Puffer enthielten darüber hinaus 3 M Natriumchlorid.

Tabelle 8: Zusammensetzung und pH-Wert der verwendeten Puffer

Puffer	Zusammensetzung	pH-Wert
PBS	10 mM Natriumdihydrogenphosphat 70 mM Natriumhydrogenphosphat 145 mM Natriumchlorid	7,6
PBS-T	PBS mit 0,05 % (m/v) Tween	7,6
Substratpuffer	200 mM Zitronensäure 3 mM Wasserstoffperoxid 0,01 % Kaliumsorbat	4,0
Probenpuffer pH 7,6	1 M TRIS, 1,5 M NaCl, 107 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 1 % BSA (m/v)	7,6
Probenpuffer pH 4,5	1 M Kaliumdihydrogencitrat, 3 M NaCl Herstellung: 5,7 g K <sub>2</sub> Citrat; 4,4 g NaCl in 15 mL Wasser lösen, pH-Wert mit 6 M NaOH einstellen und auf 25 mL auffüllen, pH-Wert überprüfen	4,5
Probenpuffer pH 9,5	1 M Glycin, 3 M NaCl, 107 mM Na <sub>2</sub> EDTA Herstellung: 3,75 g Glycin; 8,8 g NaCl; 1 g Na <sub>2</sub> EDTA; 1,05 g NaOH(s) in 40 mL Wasser lösen, pH-Wert mit 6 M NaOH einstellen und auf 50 mL auffüllen, pH-Wert überprüfen	9,5
Probenpuffer pH 10,5	1 M Glycin, 3 M NaCl, 107 mM Na <sub>2</sub> EDTA Herstellung: 3,75 g Glycin; 8,8 g NaCl; 1 g Na <sub>2</sub> EDTA; 2,05 g NaOH(s) in 40 mL Wasser lösen, pH-Wert mit 6 M NaOH einstellen und auf 50 mL auffüllen, pH-Wert überprüfen	10,5

### 3.3 Materialien

Glasfaser-Spritzenvorsatzfilter, GF/C 1,2 µm, Whatman GmbH, Dassel

Papierfaltenfilter, grade 288, Sartorius, Göttingen

PD-10 Säule, Sephadex G-25, GE Healthcare, München

Polypropylen Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 mL), Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Strata™-X SPE-Kartusche, 200 mg Sorbens, 6 mL, Phenomenex, Aschaffenburg

Zeba™ Micro Entsalzungssäulen, Pierce, Thermo Scientific

#### *HPLC-Säulen*

Phen1 C18 Umkehrphase, 250 mm x 3 mm, 5 µm, SepServ, Berlin

Purospher C18 Umkehrphase, 250 mm x 3 mm, 5 µm, VDS Optilab, Berlin

#### *Mikrotiterplatten*

Greiner Highbinding, F96, Kat. Nr. 655081, Greiner Bio-One, Frickenhausen

Greiner UV-Star, F96, Kat. Nr. 655801, Greiner Bio-One

Hirschmann Glasplatte, 96 Deep Wells, Kat. Nr. 9240196, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Nunc Maxisorp, C96, Kat. Nr. 446612, Thermo Scientific

Nunc unbehandelt, F96, Kat. Nr. 260836, Thermo Scientific

### 3.4 Geräte

Die Analyse mit LC-MS/MS wurde mit einem Agilent 1100 Flüssigkeitschromatographen (Agilent Technologies, Waldbronn) durchgeführt, bestehend aus Entgaser, binärer Pumpe, automatischem Probengeber und Säulenheizung, und einem daran gekoppelten Massenspektrometer API 4000 (AB Sciex, Darmstadt). Die Festphasenanreicherung wurde mit einer AutoTrace™ SPE Workstation (Dionex, Idstein) durchgeführt. Zur Bestimmung der Proteinmasse wurde das MALDI-TOF-Massenspektrometer Bruker Reflex III (Bruker-Daltonik, Bremen) benutzt. Für den ELISA wurden der Schüttler Titramax 101 (Heidolph, Schwabach), das automatische 96-Kanal-Waschgerät ELx405 Select (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) sowie das Photometer Spectramax Plus<sup>384</sup> (Molecular Devices, Ismaning) verwendet. Messungen des pH-Wertes wurden mit einer pH-Elektrode der Marke Inlab Expert Pro (Mettler Toledo, Gießen) durchgeführt. Das Einengen von Lösungen unter einem Stickstoffstrom passierte mit Hilfe des Evaporators SLS 02 (SLS-Labor, Bad Münstereifel). Die Durchmischung von Gemischen wurde mit dem Schwenkgerät Thermomixer Comfort (Eppendorf) erreicht. Für Zentrifugationen wurde die Mikrogefäß-Kühlzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5417 R (Eppendorf) verwendet.

Folgende Pipetten wurden verwendet:

Einkanal-Pipette: Eppendorf Research, Eppendorf Reference

Mehrkanal-Pipette: Eppendorf Research pro 8-Kanal

Multipette ("Repeater"): Eppendorf Multipette plus

96-Kanal-Pipettierstation: Mettler-Toledo Liquidator96

### 3.5 Herstellung der Enzymkonjugate

Insgesamt sechs Enzym-Tracer wurden hergestellt. Der Tracer CBZ-HRP wurde durch direkte Kopplung von CBZ an HRP hergestellt. Daneben wurden fünf Tracer mit zwischengeschaltetem Triglycin-Spacer hergestellt (CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 1-5). Die Synthesvorschriften der drei Tracer CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 2-4 wurden zusammengefasst.

#### 3.5.1 CBZ-HRP

14,5 mg (56,8 µmol) Dibenz[b,f]azepin-5-carbonylchlorid wurden in ein 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und in 95 µL Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Von dieser Stammlösung wurden 10 µL in ein weiteres Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und mit 265 µL THF versetzt. 1,0 mg (0,023 µmol) HRP wurden in ein 2 mL Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und in 100 µL Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,13 M NaHCO<sub>3</sub> in Wasser) gelöst. Unter Rühren mit einem Magnetrührer wurden 90 µL der verdünnten Säurechlorid-Lösung zugegeben. Im Abstand von jeweils 5 Minuten wurden achtmal je 2 µL der Säurechlorid-Stammlösung zugesetzt. Nach Zugabe von 0,4 mL Wasser wurde der gebildete Niederschlag, der hauptsächlich aus Iminostilben bestand, bei 25000 g (1 Minute) abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 100 µL Wasser wurde 5 Minuten bei 25000 g zentrifugiert, wobei sich eine geringe Menge Feststoff am Boden des Gefäßes bildete. Der Überstand wurde erneut abgenommen und in ein 1,5 mL Mikrozentrifugen--

röhrchen überführt. Nach Zugabe von weiteren 100  $\mu\text{L}$  Wasser wurde erneut zentrifugiert, ohne dass sich ein erkennbarer Niederschlag bildete. Diese Lösung wurde per Gelfiltration über Sephadex G-25 gereinigt (s. Kapitel 3.5.4).

### 3.5.2 CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 1

#### *Synthese des Haptens CBZ-Triglycin*

10,7 mg (57  $\mu\text{mol}$ ) Triglycin wurden in 1 mL Dinatriumtetraborat-Puffer (0,1 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , pH 9,3) gelöst. Mit 30  $\mu\text{L}$  Natriumhydroxid-Lösung (6 M) wurde ein pH-Wert von ca. 9,5 eingestellt. 1,4 mg (5,4  $\mu\text{mol}$ ) Dibenz[b,f]azepin-5-carbonylchlorid wurden in 550  $\mu\text{L}$  THF gelöst. Ein Magnetrührstäbchen wurde in ein 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und 400  $\mu\text{L}$  der Triglycin-Lösung und 400  $\mu\text{L}$  der Säurechlorid-Lösung wurden unter Rühren zugegeben. Die sofort entstandene leichte, weißliche Trübung verschwand nach Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Boratpuffer. Nach zwei Stunden Rühren wurde eine kräftige, weißliche Trübung festgestellt. Nach weiteren zwei Stunden Rührens wurde der Niederschlag durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 25000 g) gewonnen. Der Feststoff wurde zunächst durch Anblasen mit einem Stickstoffstrom, danach 48 Stunden im Exsikkator mit getrocknetem Kieselgel getrocknet. Ausbeute: 2,8 mg ungereinigtes Produkt (174 % theoretische Ausbeute bezogen auf das Säurechlorid, Reinheit nach LC-DAD-UV < 50 %).

#### *Synthese des NHS-Esters*

2,04 mg (5,0  $\mu\text{mol}$ ) des ungereinigten Haptens wurden in einem 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen mit 200  $\mu\text{L}$  THF (wasserfrei) versetzt. Die Suspension wurde gründlich durchmischt, danach 5 Minuten bei 25000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Glasgefäß überführt. Ein Magnetrührer, 0,86 mg (7,5  $\mu\text{mol}$ ) N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 1,13 mg (5,5  $\mu\text{mol}$ ) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) wurden zugegeben. Nach 18 h Reaktion unter Rühren wurde die Suspension in ein Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 mL) überführt und 5 Minuten lang bei 25000 g zentrifugiert. Der Überstand von ca. 140  $\mu\text{L}$  wurde gesammelt und teilweise für die nachfolgende Reaktion benutzt.

#### *Kopplung an Meerrettichperoxidase*

0,9 mg (0,02  $\mu\text{mol}$ ) HRP wurden in ein 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen in 100  $\mu\text{L}$  Natriumhydrogencarbonat-Puffer (0,13M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8,5) gelöst. Unter Rühren mit einem Magnetrührer wurden fünfmal im Abstand von je 10 Minuten je 10  $\mu\text{L}$  des NHS-Esters tropfenweise zugegeben. Die Reaktion wurde danach noch 2 Stunden weitergeführt. Danach wurde die Reaktionsmischung zentrifugiert (5 Minuten, 25000 g) und der Überstand auf eine Sephadex-Säule aufgetragen. Nach Reinigung wie in Kapitel 3.5.4 geschildert wurden etwa 1 mL Enzymkonjugat erhalten.

### 3.5.3 CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 2-4

Diese drei Enzymkonjugate wurden in einem gemeinsamen Ansatz synthetisiert und gereinigt. Die Bildung des Haptens und die Aktivierung verliefen bei allen drei Tracern identisch. Einziger Unterschied war die Menge an zugegebenem NHS-Ester während der

Kopplung an HRP. Die Herstellung der Zwischenstufe CBZ-Triglycin wurde gegenüber CBZ-Gly<sup>3</sup>-HRP 1 abgeändert.

#### *Bildung des Haptens CBZ-Triglycin*

41 mg (0,22 mmol) Triglycin, 54 mg Natriumcarbonat und 84 mg Natriumhydrogencarbonat wurden in einem Rundkolben in 8,4 mL Wasser gelöst (pH-Wert 9,5). 168 mg (0,66 mmol) Dibenz[b,f]azepin-5-carbonylchlorid wurden in 11,2 mL THF (wasserfrei) gelöst und umgehend zur Triglycin-Lösung gegeben. Nach Vereinigung der Lösungen wurde mit einem Magnetrührer über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösungsmittel wurde mit einem Rotationsverdampfer entfernt, wobei sich viel Niederschlag abschied, der mittels LC-MS als überwiegend Iminostilben identifiziert wurde. Die wässrige Suspension wurde in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 3000 min<sup>-1</sup> 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Glasgefäß überführt und mit 0,2 mL Phosphorsäure (85 %) auf einen pH-Wert von ca. 2 eingestellt. Nach dreimaliger Extraktion mit je 7 mL Diethylether wurde die wässrige Phase im Rotationsverdampfer von den Resten an Diethylether befreit. Kurz nach der Evaporation fiel spontan weißer Niederschlag aus, der dreimal über einer Nutsche mit je 150 µL Salzsäure (0,01 M) gewaschen und hiernach im Exsikkator mit getrocknetem Kieselgel 48 Stunden lang getrocknet wurde. Die Ausbeute an *N*-(Dibenz[b,f]azepin-5-yl-carbonyl)glycylglycylglycin (CBZ-Triglycin) betrug 17 mg (0,042 mmol; 19 % relativ zur eingesetzten Menge an Triglycin). Reinheit nach LC-DAD-UV betrug 99 % (s. Abbildung 61). Zur Charakterisierung von CBZ-Triglycin wurden das UV/VIS-Spektrum (s. Abbildung 11) und das Massenspektrum aufgenommen (Tabelle 9).

Die extrahierte Etherphase wurde ebenfalls eingedampft und der sehr geringfügige Niederschlag wurde mittels LC-DAD-UV analysiert. Er bestand zu etwa gleichen Teilen aus CBZ-Gly<sub>3</sub> und einer weiteren, unbekannten Substanz.

*Tabelle 9: Massenspektrometrische Analyse des gereinigten Haptens CBZ-Triglycin im Full Scan Modus (positive und negative Ionisierung) und Product Ion Scan Modus (positive Ionisierung, Kollisionsenergie 30 eV).*

Scanmodus	Ionisierung	m/z (relative Häufigkeit)
Full Scan	Positiv	453 (11), 431 (100), 409 (11), 374 (14), 277 (50), 249 (31), 220 (91), 194 (89), 192 (73), 165 (23)
Full Scan	Negativ	407 (93), 258 (16), 236 (31), 214 (100), 192 (7), 170 (19)
Product Ion Scan	Positiv	277 (45), 249 (43), 220 (100), 194 (18), 192 (8)

#### *Bildung des NHS-Esters*

1,9 mg CBZ-Triglycin wurden in einem 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen in 50 µL trockenem *N,N*-Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit einer kleinen Spatelspitze (ca. 1-2 mg) *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat versetzt. 0,95 mg NHS und 1,11 mg DCC wurden in jeweils 20 µL DMF gelöst und nacheinander zugefügt. Nach Schütteln bei 700 min<sup>-1</sup> (Eppendorf Thermomixer) bei Raumtemperatur bildete sich der NHS-Ester. Der gebildete Niederschlag wurde durch Zentrifugation bei 25000 g (5 Minuten) entfernt. Von den erhaltenen 90 µL Reaktionslösung wurden 36 µL für die nachfolgenden Reaktionen eingesetzt. Der Rest wurde portionsweise unter Stickstoffstrom getrocknet und bis zur Synthese von CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 5 bei 4°C gelagert.



*Kopplung an Meerrettichperoxidase*

Drei Ansätze von je 1,0 mg (23 nmol) HRP wurden in je 100 µL Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,13 M, pH 8,1) in einem 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gelöst. Die drei Ansätze wurden mit 1 µL, 5 µL bzw. 30 µL an NHS-Ester versetzt und eine Stunde lang bei 700 min<sup>-1</sup> geschüttelt. Für den zweiten und dritten Ansatz wurde diese Menge in fünf Portionen unterteilt, die in einem Abstand von je 10 Minuten tröpfchenweise hinzugegeben wurde (s. Tabelle 10). Nach einer weiteren Stunde Schüttelns wurde die Lösung wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben gereinigt.

Tabelle 10: Herstellung der Tracer CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 2-4.

Tracerbezeichnung	Zugegebene Menge an NHS-Ester	Molarer Überschuss <sup>1</sup> an NHS-Ester bezogen auf HRP
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 2	1 µL	2,2
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 3	5 µL (5 × 1 µL)	12
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 4	30 µL (5 × 6 µL)	71

<sup>1</sup> Berechnung unter der Annahme einer 100%igen Ausbeute bei der Bildungsreaktion.

### 3.5.4 CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 5

4,5 mg (11 µmol) CBZ-Triglycin wurden in einem 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen in 50 µL DMF (wasserfrei) gelöst. Eine kleine Spatelspitze (ca. 1 mg) DSC wurde hinzugefügt. 3,0 mg DCC (14 µmol) wurden in 24 µL DMF gelöst und hinzugefügt. 2,3 mg (20 µmol) NHS wurden in 18 µL DMF gelöst und hinzugefügt. Die Reaktion wurde über Nacht bei Raumtemperatur im Thermoblock geschüttelt (700 min<sup>-1</sup>). Der gebildete hellgraue Niederschlag wurde durch Zentrifugation (5 Minuten, 25000 g) entfernt. Der gesamte Überstand von ca. 80 µL wurde für die nachfolgende Reaktion verwendet.

11 mg (0,28 µmol) HRP wurde in einem Mikrozentrifugenröhrchen in 600 µL Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,13 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6) gelöst. Die NHS-Ester-Lösung wurde mit ca. 1,5 µmol getrocknetem NHS-Ester versetzt, der bei der Herstellung der Tracer CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 2-4 nicht benötigt und aufbewahrt wurde. Der NHS-Ester lag somit gegenüber der HRP in etwa 45-fachem molaren Überschuss vor. 20 µL dieser Lösung wurden unter Schütteln im Thermoblock (Raumtemperatur) zur Peroxidase gegeben. Im Abstand von je 10 Minuten wurden drei weitere Portionen von je 20 µL NHS-Ester zugegeben. Nach weiteren zwei Stunden Schüttelns wurde die trübe Reaktionslösung zentrifugiert (5 Minuten bei 25000 g) und der Überstand abgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die nun klare Lösung per Gelfiltration gereinigt (Kapitel 3.5.4).

Dieses Konjugat trug intern die Bezeichnung PAZ- CBZ-T-01.

### 3.5.5 Gelfiltrationschromatographische Reinigung der Enzymkonjugate

Eine PD-10-Säule, gefüllt mit Sephadex G25, wurde mit 100 mL Puffer (1 mM Natriumphosphat, 15 mM Natriumchlorid, pH 7,6) konditioniert. Die vorher zentrifugierte Probe (25000 g, 5 Minuten) wurde tröpfchenweise gleichmäßig auf die Fritte verteilt. 200 µL Puffer wurden auf die Fritte getropft und gleichmäßig verteilt, um ein



Einsickern der Proteinlösung zu erreichen. 5 mL Puffer wurden auf die Kartusche gegeben, das Eluat wurde in einer Mikrotiterplatte (Nunc, unbehandelt) gesammelt, wobei je drei Tropfen in einer Kavität gesammelt wurden. Die Platte wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm, dem Absorptionsmaximum der Peroxidase, gemessen. Die Fraktionen mit einer optischen Dichte größer als 0,1 wurden gesammelt und vereinigt (s. Abbildung 10).

Für die Langzeitlagerung wurde die Lösung im Volumenverhältnis von 1:1 mit der Stabilisierungslösung Guardian versetzt und bei 4°C gelagert.

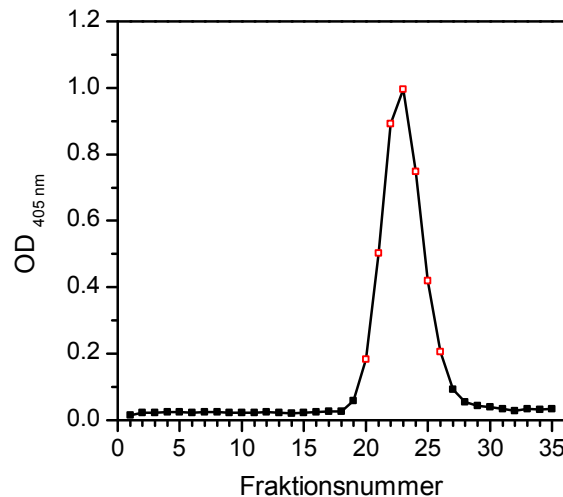


Abbildung 10: Optische Dichte (405 nm) der Fraktionen nach gelchromatographischer Fraktionierung des Tracers CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 1. Die Fraktionen mit einer OD oberhalb von 0,1 (rot markiert) wurden gesammelt und vereinigt.

### 3.5.6 Charakterisierung der Enzymkonjugate

#### MALDI-TOF-MS

Die Durchführung der Analyse ist an anderer Stelle detailliert beschrieben worden [280]. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden von jedem Protein 5-13 Spektren aufgenommen. Zusammen mit den Enzymkonjugaten wurde auch die Masse des ungekoppelten Enzyms gemessen. Mit Hilfe eines Least-Square-Algorithmus wurde zwischen  $m/z$  40.000 und 50.000 eine Lorentz-Funktion an die summierten Spektren angepasst. Das Zentrum der Lorentz-Funktion ergab näherungsweise die mittlere Masse des Proteins. Die Kopplungsdichte wurde als Quotient aus der Differenz beider Massen und der Molekülmasse des anzukoppelnden Restes berechnet.

#### UV/VIS-Spektroskopie

Vor der Bestimmung der Kopplungsdichte wurde die Konzentration des Enzymkonjugats bestimmt (siehe unten) und eine Lösung ungekoppelter Peroxidase sowie eine Lösung mit Hapten gleicher molaren Konzentrationen hergestellt. Je 200 µL des ungekoppelten Enzyms, des Konjugats und des Haptens wurden auf eine UV-Star Mikrotiterplatte aufgetragen. Das Spektrum im Wellenlängenbereich von 200 bis 700 nm wurde mit einem Photometer (SpectraMax Plus<sup>384</sup>) aufgezeichnet.

Die Angleichung der molaren Konzentrationen von Enzymkonjugat und ungekoppelter Peroxidase gelang dabei nicht immer perfekt, so dass die gemessenen Soret-Banden beider Proteine nicht deckungsgleich waren. Wenn nötig, wurde daher das Spektrum des Konjugats an das Spektrum des ungekoppelten Enzyms angeglichen. Hierzu wurden alle Absorptionswerte des Konjugats mit dem Verhältnis der Absorption von ungekoppeltem Enzym und Konjugat bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  multipliziert. Anschließend wurde die Differenz aus der Absorption von Konjugat und der Absorption des ungekoppelten Enzyms bei  $\lambda = 285 \text{ nm}$  gebildet. Die Kopplungsdichte wurde errechnet als Quotient aus dieser Differenz und der Absorption des Haptens bei  $\lambda = 285 \text{ nm}$ . Abbildung 11 veranschaulicht das Vorgehen graphisch.

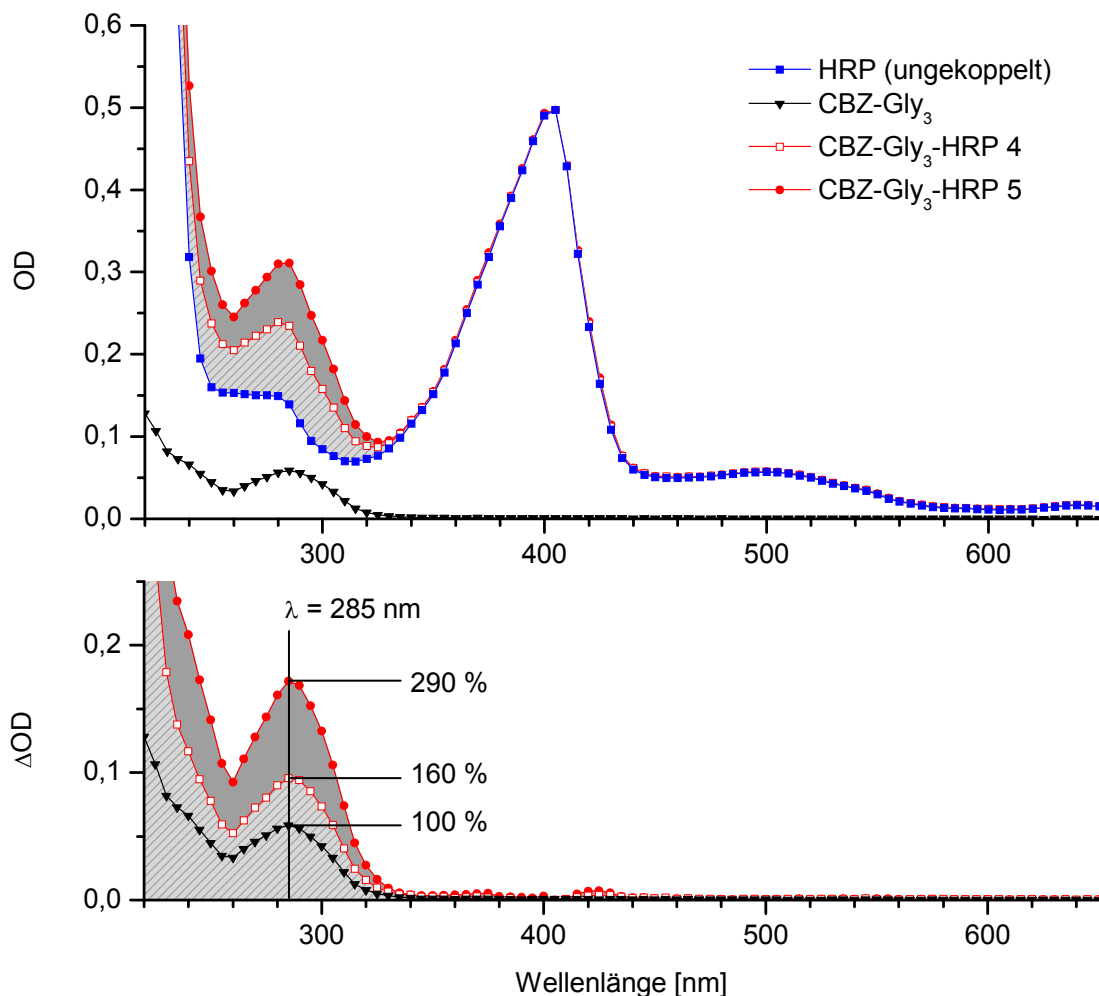


Abbildung 11: Bestimmung der Kopplungsdichte anhand des UV/VIS-Spektrums; oben: Die Spektren von HRP und dem Hapten CBZ-Gly<sub>3</sub> wurden bei exakt gleicher molarer Konzentration gemessen. Die Spektren der Enzymkonjugate wurden bei ähnlicher molarer Konzentration gemessen und bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  an das HRP-Spektrum angeglichen; unten: Die Differenz aus dem Spektrum von Konjugat und ungekoppeltem Enzym wurde gebildet und in Relation zum Spektrum des Haptens gesetzt.

Unterhalb von 300 nm zeigt Peroxidase das für Proteine charakteristische Absorptionsverhalten (s. Abbildung 22a). Hier befindet sich der Absorptionsbereich der Aminosäuren, wobei die Absorption zwischen 240 und 280 nm von aromatischen Aminosäuren verursacht wird. Aufgrund der Hämeinheit in der Peroxidase treten weitere Banden bei 403 nm

(Soret-Bande), 498 nm und 640 nm auf mit Extinktionskoeffizienten von 102; 11,25 bzw. 3,23  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  [281, 282]. Da die meisten anderen Proteine bei 403 nm keine nennenswerte Absorption zeigen, kann der Grad der Verunreinigungen mit Proteinen durch das Verhältnis aus den Absorptionswerten bei 403 nm und 280 nm (Reinheitszahl) herangezogen werden [283]. Werte zwischen 3,0 und 3,4 gelten als optimal (gemessen: 3,3).

#### *Konzentrationsbestimmung des Konjugats*

Zur Bestimmung der Konzentration der Peroxidase wurden fünf Peroxidase-Lösungen verschiedener Konzentrationen sowie die zu messenden Proben auf eine UV-Star Mikrotiterplatte aufgetragen. Die optische Dichte wurde mit einem Photometer (SpectraMax Plus<sup>384</sup>) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Mit den Lösungen bekannter Peroxidase-Konzentration wurde eine Kalibrierkurve erstellt, die zur Bestimmung der Konzentration der unbekannten Lösungen verwendet wurde.

Die erhaltenen Konzentrationen stimmten dabei näherungsweise mit denjenigen Werten überein, die sich nach der Messung der Absorption bei 403 nm mit Hilfe des aus der Literatur bekannten molaren Absorptionskoeffizienten von 102  $\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$  errechneten. Die leichten Abweichungen zwischen diesen beiden Verfahren dürften zum einen auf herstellungsbedingte Variationen im Absorptionsspektrum dieses Naturstoffs, zum anderen auf Messunsicherheiten zurückzuführen sein.

## 3.6 Immunchemische Methoden

### 3.6.1 Durchführung des ELISAs

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene ELISA-Methoden für die Quantifizierung von CBZ benutzt. Die beiden Methoden, im Folgenden mit A und B bezeichnet, unterschieden sich im Wesentlichen durch die Zusammensetzung des Probenpuffers und die eingesetzten Volumina. Von Methode B leitete sich der Dual-Analyt-ELISA ab, der mit demselben Antikörper die gleichzeitige Bestimmung von CBZ und Cetirizin erlaubte (s. Kapitel 4.5.2).

#### *CBZ-ELISA - Methode A*

Der gesamte ELISA wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine transparente, hochbindende Mikrotiterplatte wurde mit sekundärem Antikörper (Acris R1612P; 1 mg/L; 200  $\mu\text{L}$  pro Kavität) beschichtet und mit Parafilm versiegelt. Nach Schwenken über Nacht auf einem Orbitalschüttler (Titramax 101) bei 750  $\text{min}^{-1}$  wurden die Kavitäten der Platte dreimal mit einem automatischen Waschgerät mit PBS-T gewaschen. Nach Ausklopfen der Platte wurden pro Kavität 200  $\mu\text{L}$  des primären Antikörpers (BIODESIGN G31234M; 8,6  $\mu\text{g/L}$ ) aufgetragen und eine Stunde lang geschwenkt. Nach erneutem Waschen und Ausklopfen wurden pro Kavität 25  $\mu\text{L}$  des Probenpuffers aufgetragen, danach je 175  $\mu\text{L}$  der Kalibrierlösungen und der Proben sowie 50  $\mu\text{L}$  Enzymkonjugatlösung (118 pmol/L in PBS). Nach 30 Minuten Schwenken wurde die Platte erneut gewaschen und trockengeklopft. Pro Kavität wurden 200  $\mu\text{L}$  Substratlösung aufgetragen und 30 Minuten lang inkubiert. Die Substratlösung wurde nach Frey et al. [284] durch Verdünnung der Stammlösung

(41 mM TMB, 8 mM Tetrabutylammoniumborhydrid in *N,N*-Dimethylacetamid) hergestellt. Hierzu wurden 540 µL der Stammlösung in 21,5 mL Substratpuffer verdünnt. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von 100 µL 1M Schwefelsäure beendet. Die optische Dichte wurde mit einem Photometer (SpectraMax Plus<sup>384</sup>) bei der Wellenlänge 450 nm gemessen. Außerdem wurde die optische Dichte bei der Referenzwellenlänge 650 nm gemessen.

#### *CBZ-ELISA - Methode B*

Die Beschichtung der Platten entsprach dem Vorgehen wie bei Methode A. Nach dem Waschschrift wurden 150 µL der Kalibrierlösung bzw. der Proben zugegeben. Danach wurden 50 µL des Enzymkonjugats in Probenpuffer (118 pmol/L; pH 10,5) zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Kavitäten gewaschen und wie bei Methode A mit Substrat gefüllt. Nach Zugabe von Schwefelsäure wurde die photometrische Messung wie bei Methode A durchgeführt.

#### *Cetirizin-ELISA*

Die Bestimmung der Konzentration von Cetirizin wurde mit zwei ELISA-Messungen bei den pH-Werten 4,5 und 10,5 (Methode B) erreicht. Die Messung bei pH 4,5 erfolgte wie bei Methode B, aber mit einem anderen Probenpuffer. Aus den beiden gemessenen Äquivalentkonzentrationen  $c_{\text{ELISA}}$  und den Kreuzreaktivitäten CR wurden die Konzentrationen von CBZ ( $c_{\text{CBZ}}$ ) und Cetirizin ( $c_{\text{Cetirizin}}$ ) über die Lösung des folgenden linearen Gleichungssystems berechnet:

$$c_{\text{ELISA pH4,5}} = c_{\text{CBZ}} + \text{CR}_{\text{pH4,5}} \cdot c_{\text{Cetirizin}} \quad (10)$$

$$c_{\text{ELISA pH10,5}} = c_{\text{CBZ}} + \text{CR}_{\text{pH10,5}} \cdot c_{\text{Cetirizin}} \quad (11)$$

Hieraus folgte für die Konzentration von Cetirizin:

$$c_{\text{Cetirizin}} = \frac{c_{\text{ELISA pH4,5}} - c_{\text{ELISA pH10,5}}}{\text{CR}_{\text{pH4,5}} - \text{CR}_{\text{pH10,5}}} \quad (12)$$

Die Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde mit einem verkürzten Verfahren durchgeführt (s. Kapitel 2.4.3). Bei pH 4,5 wurden zusätzlich zu den CBZ-haltigen Kalibrierlösungen vier Lösungen mit einer Cetirizin-Konzentration von 30, 100, 300 und 1000 ng/L aufgetragen, bei pH 10,5 betrug die Cetirizin-Konzentration dieser Lösungen 300, 1000, 3000 und 10000 ng/L. Zu diesen Lösungen wurden mit Hilfe der CBZ-Kalibrierkurve die CBZ-Äquivalentkonzentrationen berechnet. Aus der erhaltenen Konzentration und der eingesetzten Cetirizin-Konzentration wurde der Quotient gebildet. Die Kreuzreaktivität wurde als Mittelwert der für die vier Lösungen erhaltenen Quotienten errechnet.

Die Messunsicherheit  $\sigma$  der Cetirizin-Bestimmung lässt sich aus den Fehlerbeiträgen bei pH 4,5 ( $\sigma_{\text{ELISA pH4,5}}$ ) und bei pH 10,5 ( $\sigma_{\text{ELISA pH10,5}}$ ) näherungsweise berechnen. Nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung folgt aus Gleichung (12):

$$\sigma = \frac{\sigma_{\text{ELISA pH4,5}} + \sigma_{\text{ELISA pH10,5}}}{\text{CR}_{\text{pH4,5}} - \text{CR}_{\text{pH10,5}}} \quad (13)$$

### *Koffein-ELISA*

Zahlreiche in dieser Arbeit untersuchte Wasserproben wurden zusätzlich mit einem von Carvalho entwickelten ELISA [126] auf ihren Koffein-Gehalt untersucht. Diese Ergebnisse sind der Vollständigkeit halber in den Tabellen im Anhang vermerkt, ohne dass sie in dieser Arbeit diskutiert werden.

### 3.6.2 Kalibrierung und Auswertung des ELISAs

Die Kalibrierlösungen wurden hergestellt, indem aus einer methanolischen CBZ-Stammlösung ( $c = 1 \text{ g/L}$ ) verdünnte Kalibrierlösungen hergestellt wurden. In der Regel wurden 8 Kalibrierlösungen in Dreifachbestimmung gemessen. Sechs der Konzentrationen wurden in näherungsweise logarithmischen Intervallen um den Testmittelpunkt herum angeordnet: 0,01; 0,03; 0,10; 0,30; 1,0; 3,0  $\mu\text{g/L}$ . Für eine bessere Konvergenz der Kalibrierkurve sind zwei Ankerkonzentrationen (0 und 1000  $\mu\text{g/L}$ ) sinnvoll. Diese Ankerpunkte sind für eine zuverlässige Bestimmung der Funktionsparameter in der 4-Parameter-Formel (s. Kapitel 2.4.2) notwendig und wurden deshalb vor allem während der Methodenoptimierung benutzt. Für die Quantifizierung von Wasserproben sind diese Ankerkonzentrationen nicht nötig und wurden daher in vielen Fällen durch Kalibrierlösungen im Quantifizierungsbereich ersetzt.

Vor der Auswertung des ELISAs wurden die gemessenen Extinktionswerte bei der Wellenlänge 450 nm um den Betrag der Extinktion bei der Referenzwellenlänge 650 nm verringert. Dies verringert in grober Näherung Störungen der Messung durch Staub, Kratzer auf der Plattenoberfläche und ähnliche Einflüsse.

Mit Hilfe der Software Softmax Pro 5.3 wurde die 4-Parameter-Funktion an die gemittelten Messwerte angepasst. Die Regressionsanalyse wurde mit Hilfe eines gewichteten Least-Square-Algorithmus durchgeführt. Als Wichtungsfaktor wurde der Kehrwert des Quadrates der Standardabweichung des jeweiligen Datenpunktes benutzt. [277]. Diese Wichtung wurde in Ausnahmefällen nicht verwendet, wenn weniger als drei Replikate pro Kalibrierlösung verwendet wurden.

### 3.6.3 Pipettierschema

Die Reihenfolge des Pipettierens und die Verteilung der Proben können einen Einfluss auf die Genauigkeit des Analysenergebnisses haben. In der vorliegenden Arbeit wurden im Wesentlichen zwei Pipettierschemata verwendet.

*Pipettierschema A*

Die Beschichtung der Platte mit den beiden Antikörperlösungen wurde mit einer Multipette durchgeführt. Dabei wurden die zwölf Spalten der Mikrotiterplatte nacheinander von links nach rechts befüllt (s. Abbildung 12). Je 700  $\mu\text{L}$  der Kalibrierlösungen und der zu untersuchenden Proben wurden in einem vorbereitenden Schritt zunächst in eine DeepWell-Platte aus Glas pipettiert. Danach wurden hieraus mit einer 8-Kanal-Pipette je drei Replikate à 200  $\mu\text{L}$  in die ELISA-Platte übertragen (s. Abbildung 13). Dabei wurden die Lösungen verschachtelt angeordnet, um eine Verteilung über die Plattenbreite zu erreichen (s. Abbildung 14). Alle anschließenden Arbeitsschritte (Tracerzugabe, Substratzugabe, Stoppen der Farbreaktion) wurden analog zur Antikörperbeschichtung mit einer Multipette ausgeführt.

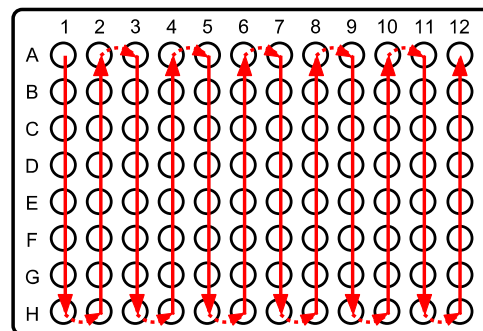


Abbildung 12: Reihenfolge, in der die Kavitäten beim Pipettieren von Antikörper, Tracerlösung, Substrat und Stopplösung befüllt wurden. Mit einer Multipette wurde beginnend bei A1 zunächst die gesamte Spalte befüllt und sodann mit der benachbarten Spalte fortgefahren.

1. Vorpipettieren von je 700  $\mu\text{L}$  Lösung in DeepWell-Platte aus Glas
2. Übertragen der Lösungen mit 8-Kanal-Pipette, dreimal je 200  $\mu\text{L}$

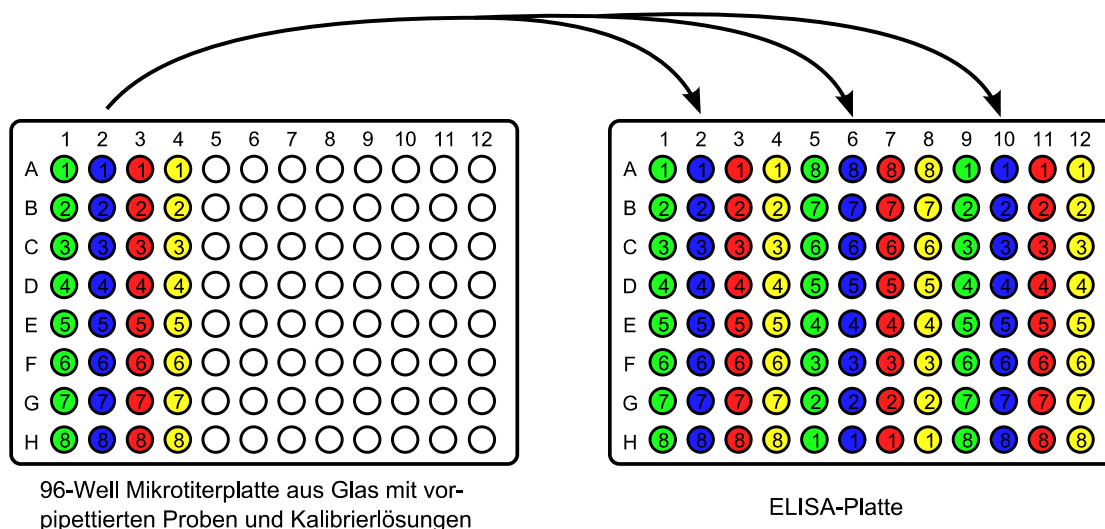


Abbildung 13: Je 700  $\mu\text{L}$  der Proben und Kalibrierlösungen wurden zunächst in eine DeepWell-Platte vorpipettiert. Mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette wurden je drei Replikate à 200  $\mu\text{L}$  aus den vorpipettierten Spalten in die vorbereitete ELISA-Platte übertragen. Die drei Replikate wurden dabei gleichmäßig über die Plattenbreite verteilt.

*Pipettierschema B*

Die Beschichtung mit sekundärem und primärem Antikörper wurde mit der Liquidator96-Pipettierstation durchgeführt. Mit dieser Pipettierstation wurden die meisten ELISA-Arbeitsschritte durchgeführt. Der Tracer wurde wegen des geringen Arbeitsvolumens wie bei Pipettierschema A mit einer Multipette (s. Abbildung 12) und die Proben mit einer

8-Kanal-Pipette (s. Abbildung 13) pipettiert. Diese Schritte wurden nicht mit dem Liquidator96 durchgeführt, da dies das Vorlegen von erheblich mehr Tracer-Lösung bzw. einen deutlich höheren Arbeitsaufwand erfordert hätte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	K1	9	17	8	K8	16	24	1	K1	9	17
B	2	K2	10	18	7	K7	15	23	2	K2	10	18
C	3	K3	11	19	6	K6	14	22	3	K3	11	19
D	4	K4	12	20	5	K5	13	21	4	K4	12	20
E	5	K5	13	21	4	K4	12	20	5	K5	13	21
F	6	K6	14	22	3	K3	11	19	6	K6	14	22
G	7	K7	15	23	2	K2	10	18	7	K7	15	23
H	8	K8	16	24	1	K1	9	17	8	K8	16	24

Abbildung 14: Verteilung der Proben 1-24 und der Kalibrierlösungen K1-K8 auf einer 96-well-Mikrotiterplatte. Diese Verteilung ist geeignet, bei einer Plattendrift die Richtigkeit zu erhöhen. Aus 32 vorpipettierten Wells einer Reservoir-Platte lassen sich die Lösungen mit einer 8-Kanal-Pipette schnell und mit geringer Fehlerquote auf die ELISA-Platte übertragen.

### 3.6.4 Bestimmung der Nachweisgrenze und der Bestimmungsgrenze

Als Nachweisgrenze (LOD) und als Bestimmungsgrenze (LOQ) wurden diejenigen Konzentrationen bestimmt, die gerade noch mit einer relativen Standardabweichung von 30 % bzw. 10 % bestimmt werden konnten. Hierzu wurde zunächst zu jedem Punkt der Kalibrierkurve gemäß Formel (5) die relative Standardabweichung der Konzentration  $\Delta x$  berechnet. Um das Präzisionsprofil zu erhalten, wurde für die erhaltenen Punkte mit folgender Funktion eine Regressionsanalyse durchgeführt:

$$p(x) = d * x + e + \frac{g}{x} \quad (14)$$

Folgender Term wurde dabei mit Hilfe des Moduls Solver in Microsoft Excel minimiert:

$$\sum_n \left( \frac{\Delta x - p(x)}{\frac{1}{2}(\Delta x + p(x))} \right)^2 \quad (15)$$

Der Vorgang ähnelt der Methode der „kleinsten Quadrate“ (least squares). Der Nenner im obigen Term wurde eingeführt, um jedem der n Datenpunkte in etwa dieselbe Wichtung zukommen zu lassen, unabhängig von der Höhe der OD.

Als Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze wurden die x-Werte berechnet, für die für  $p(x)$  Werte von 0,3 bzw. 0,1 erhalten wurden.

### 3.6.5 Kreuzreaktivitäten

Die relative Empfindlichkeit (Kreuzreaktivität) des ELISAs gegenüber anderen Verbindungen wurde bestimmt, indem verschiedene Konzentrationen der entsprechenden Substanz im ELISA gemessen wurden. Für die Berechnung der dimensionslosen Kreuzreaktivität CR nach Formel (8) ist zunächst eine Kalibrierung der Messpunkte mit der 4-Parameter-Formel nötig, um die Testmittelpunkte von CBZ und des Kreuzreaktanden zu bestimmen. Die Kreuzreaktivität ergibt sich dann als:

$$CR = \frac{C_{CBZ}}{C_{Substanz}} \quad (16)$$

$C_{CBZ}$  und  $C_{Substanz}$  stehen für die Testmittelpunkte (Wendepunkte) der Kalibrierkurven, die mit Lösungen von CBZ bzw. der zu testenden Substanz erstellt wurden.

Es ist zwischen molaren und massenbezogenen (spezifischen) Kreuzreaktivitäten zu unterscheiden, die aus der molaren Konzentration bzw. der Massenkonzentration berechnet wurden.

Um die Kreuzreaktivität von Cetirizin im Dual-Analyt-ELISA zu ermitteln, wurde eine andere Bestimmungsmethode benutzt (s. Kapitel 3.6.1). Da hierfür bereits vor der Messung die ungefähre Höhe der Kreuzreaktivität bekannt sein muss, wurde diese alternative Bestimmungsmethode nur im Dual-Analyt-ELISA eingesetzt.

#### *Reinheit der Chemikalien*

Bei der Bestimmung der Kreuzreaktivität wurde große Sorgfalt darauf verwendet, dass die getesteten Substanzen keine Spuren von CBZ enthielten. Hierzu wurde mit Hilfe von HPLC-MS/MS der Gehalt von CBZ in DiH-CBZ, DiOH-CBZ, 10-OH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, EP-CBZ, Ox-CBZ sowie in Opipramol, Amitriptylin, Doxepin und Protriptylin bestimmt. Weitere Substanzen wurden nicht überprüft, da nur in den genannten Stoffen eine Verunreinigung mit CBZ als wahrscheinlich erschien. DiH-CBZ, EP-CBZ und OX-CBZ enthielten ca. 10 %, 0,8 % bzw. 0,5 % CBZ, alle übrigen Gebinde weniger als 0,01 % CBZ. DiH-CBZ wurde daher per HPLC gereinigt [280], auf die Reinigung von EP-CBZ und Ox-CBZ wurde aus Zeitgründen verzichtet.

Alle übrigen Reagenzien wurden benutzt wie vom Hersteller erhalten.

### 3.6.6 Plattenkonservierung

Die Konservierungslösung wurde hergestellt, indem 0,11 g BSA, 0,11 g Polyvinylalkohol und 0,11 g Trehalose-Dihydrat in insgesamt 22 mL PBS unter Rühren über Nacht gelöst wurden. Nichtgelöste Bestandteile wurden durch Filtrieren mit einem Faltenfilter entfernt. Die zu konservierende Platte wurde zunächst analog wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben beschichtet. Nach der Inkubation von sekundärem und primärem Antikörper wurde die Platte mit PBS-T gewaschen und ausgeklopft. Je 200  $\mu$ L der Konservierungslösung wurden pro Kavität auf die Platte aufgetragen. Nach einer Stunde Schwenkens bei  $750 \text{ min}^{-1}$  wurde die Platte ohne Spülen entleert und ausgeklopft und 90 Minuten im Trockenschrank bei  $40^\circ\text{C}$  getrocknet.



Danach wurde die Platte mit Parafilm versiegelt und in einer verschließbaren, luftundurchlässigen Plastikdose bei 4°C gelagert. Zum Schutz vor Feuchtigkeit wurde eine kleine Menge getrocknetes Kieselgel (ca. 20 g) in einen Teefilter gefüllt und in die Dose gelegt. Diese Platten konnten mindestens drei Monate lang ohne weitere Vorbereitungen für den ELISA genutzt werden (s. Kapitel 4.3.8).

### 3.6.7 LC-ELISA

Die Durchführung des LC-ELISA ist detailliert an anderer Stelle veröffentlicht worden [285].

## 3.7 Referenzanalytik

Für die Quantifizierung der organischen Spurenstoffe in Gewässern wurden im Laufe der Arbeit zwei verschiedene Methoden benutzt. Um den CBZ-ELISA zu validieren, wurde zunächst eine relativ einfache Methode entwickelt. Diese Methode war für die Bestimmung von CBZ in Oberflächengewässern vorgesehen und diente der Verifizierung der ELISA-Ergebnisse. Details hierzu wurden gesondert veröffentlicht [280].

Hiernach wurde eine weitere Methode entwickelt, die neben CBZ auch die Quantifizierung von Metaboliten und Cetirizin ermöglichte. Diese Methode wird im Folgenden beschrieben.

### 3.7.1 Festphasenanreicherung (SPE)

Für die Gewässeruntersuchungen wurden die Proben mit Festphasenanreicherung gereinigt. Diese Methode wurde adaptiert von Lacey et al. [222]. Wenn nicht anders erwähnt, wurde hierbei ein Anreicherungsfaktor von 20 benutzt. Die Proben wurden mit einem Faltenfilter (Sartorius Grade 288) filtriert. In einem Probenvolumen von 50 mL wurde eine Endkonzentration von je 0,5 µg/L der internen Standards <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-CBZ und Cetirizin-d<sub>8</sub> eingestellt. Hierzu wurde eine wässrige Stammlösung (ca. 0,5 mg/L) des internen Standards benutzt.

Die Festphasenanreicherung wurde mit 6 mL Strata-X Kartuschen (200 mg Sorbens) in einer 6-Kanal-Workstation (AutoTrace, Dionex) durchgeführt. Vor der Anreicherung wurden die Kartuschen mit 10 mL Methanol und anschließend mit 10 mL Wasser gespült. Nach dem Beladen mit 20 mL Probe wurden die Säulen 30 Minuten lang mit Stickstoff getrocknet. Nach der Elution mit 10 mL Methanol wurden die Eluate unter einem Stickstoffstrom eingedampft (SLS 02 Evaporator) und anschließend mit 1 mL 30:70 Methanol:Wasser (v:v) rekonstituiert.

Vor der Injektion in den Flüssigchromatographen wurden die Proben mit einer Polyethylen-Spritze aufgezogen und durch einen Spritzenvorsatzfilter (Glasfaser; 1,3 µm; Whatman) filtriert.

### 3.7.2 LC-MS/MS

Für die chromatographische Trennung wurde eine Phen1 RP-C18 (250 × 3 mm; 5 µm) Säule mit Vorsäule (Phen 1; 10 × 3 mm) benutzt. Die Säule wurde mit einem Säulenofen auf 40°C temperiert. Die Flussrate betrug 0,4 mL/min, das Injektionsvolumen 50 µL. Ein binärer

Gradient bestehend aus Wasser und Methanol wurde benutzt: Der Methanolanteil wurde für 5 Minuten bei 50 % gehalten, danach innerhalb von 13 Minuten auf 95 % gesteigert und 10 Minuten beibehalten. Danach wurden innerhalb einer Minute die Anfangsbedingungen hergestellt und bis zur Injektion der nächsten Probe 10 Minuten lang gehalten. Der Vorsäulendruck vor Injektion der Probe betrug ca. 190 bar.

Das Massenspektrometer wurde im Multiple Reaction Monitoring (MRM) Modus betrieben. Für jeden Analyten wurden zwei Übergänge analysiert: Der erste Übergang diente der Quantifizierung (Quantifier), der zweite Übergang dem Nachweis der Identität (Qualifier). Dies entspricht den Erfordernissen der EU-Direktive 2002/657/EG [286]. Die benutzten Geräteparameter sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

*Tabelle 11: MS/MS Parameter für die Quantifizierung verschiedener Analyten in Gewässern; weitere Parameter: Collision gas: 41 kPa; curtain gas: 172 kPa; ion source gas #1: 345 kPa; ion source gas #2: 414 kPa; source temperature: 400°C; entrance potential: 10 V; declustering potential: 60 V; ion spray voltage: 4,5 kV; dwell time: 100 ms (alle Übergänge).*

Substanz	RT [min]	MRM1 (Quantifier)		MRM2 (Qualifier)		LOQ [µg/L]
		Übergang	CE [eV]	Übergang	CE [eV]	
DiOH-CBZ	7,5	253→180	35	271→253	18	0,20
2-OH-CBZ	8,6	253→210	28	253→208	31	0,05
10-OH-CBZ	8,7	237→194	18	255→237	25	0,13
EP-CBZ	9,5	253→180	35	253→236	22	0,03
3-OH-CBZ	10,5	253→210	28	253→208	31	0,05
Ox-CBZ	11,5	253→236	22	253→208	31	0,14
<sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N-CBZ	15,2	239→192	30	-	-	
CBZ	15,2	237→194	25	237→179	50	0,03
Cetirizin-d <sub>8</sub>	18,2	397→201	28	-	-	
Cetirizin	18,2	389→201	28	389→166	60	0,06

RT: Retentionszeit; CE: collision energy

Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software Analyst 1.4.2 durchgeführt, die eine automatische Integration der Peakfläche erlaubte. Für die Quantifizierung von Cetirizin wurde der interne Standard Cetirizin-d<sub>8</sub> benutzt, für alle übrigen Analyten <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-CBZ. Hierbei wurden bei der Herstellung der Proben entstandene Konzentrationsunterschiede und Verdünnungseffekte berücksichtigt. Die Chromatogramme der Kalibrierlösungen sind in Abbildung 15 abgebildet.

Die Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ) wurden mit Hilfe von Kalibrierlösungen in Reinstwasser bestimmt. Als LOD und LOQ wurden näherungsweise die Analytkonzentrationen bestimmt, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis einen Wert von 3 bzw. 10 annahm. Diese Bestimmung wurde mit Hilfe der Software Analyst 1.4.2 durchgeführt.

Zur Validierung der Methode wurden die Wiederfindungsraten in verschiedenen Matrices gemessen. Die Wiederfindungsrate ist das Verhältnis der Menge des Analyten, mit der die Probe vor der Probenvorbereitung dotiert wurde, und der Menge dieses Analyten, die als Messergebnis gefunden wurde. Als absolute Wiederfindungsrate wird in dieser Arbeit die Wiederfindungsrate ohne Berücksichtigung des isotonenmarkierten Standards bezeichnet.

Als relative Wiederfindungsrate wird die Wiederfindungsrate relativ zur (absoluten) Wiederfindungsrate des internen Standards bezeichnet.

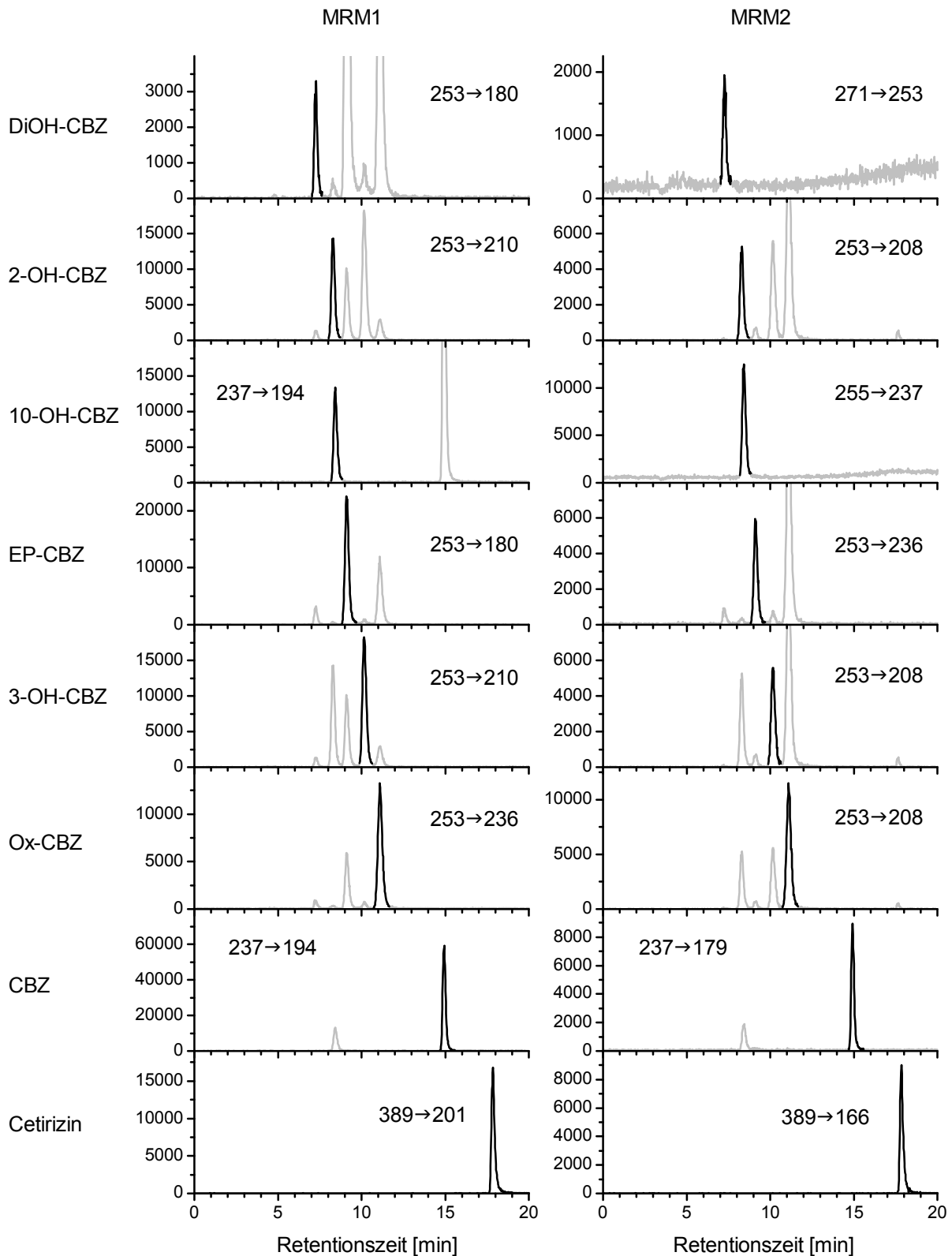


Abbildung 15: Chromatogramme zu allen untersuchten MRM-Spuren; fett gedruckt der jeweilige Peak der links genannten Substanz; Kalibrierlösungen in Reinstwasser bei einer Konzentration von 1 µg/L.

## 3.8 Untersuchungen von Gewässerproben

### 3.8.1 Probennahme

Die Probennahme geschah unter Einhaltung der DIN-Norm 38402 (A15). Die Wasserproben wurden in der Regel mit Hilfe einer Teleskopstange mit angebrachtem Schöpfbecher entnommen (Länge des Auslegers: 4 m), teilweise kam auch eine Schnur mit angebrachtem Becher zum Einsatz. Die Probe wurde in größtmöglicher Entfernung vom Ufer von der Oberfläche entnommen. Dies geschah je nach Beschaffenheit der Probennahmestelle am Ufer, an einer Brücke, an einem Bootsanleger oder ähnlichem. Einige Proben wurden von einem Boot aus genommen. Der Schöpfbecher und die Probengefäße — braune Glasflaschen — wurden dabei vor der Probennahme mehrmals mit der Probe gespült. Das entnommene Volumen variierte zwischen 15 mL und 4 L.

Darüber hinaus wurden von den Berliner Wasserbetrieben Abwasserproben (je 1 L) aus sechs Berliner Klärwerken zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe eines automatischen Proben-sammlers wurden 24-Stunden-Mischproben aus dem ungeklärten Zulauf und dem Ablauf nach der letzten Klärstufe gesammelt. Die Sammlung dieser Proben geschah proportional zur Flussrate im Klärwerk, von 0 Uhr bis 24 Uhr des entsprechenden Tages. Außerdem wurden auf dieselbe Weise an zwei Tagen je zwölf 2-Stunden-Mischproben aus dem Klärwerk Waßmannsdorf gesammelt.

Alle Proben wurden bis zur Analyse in braunen Gefäßen bei 4°C gelagert. Die Analyse mit LC-MS/MS fand innerhalb von sieben Tagen nach Probennahme statt. Für die Messung mit dem ELISA wurden Proben bis zur Messung bis zu 12 Tage lang gelagert. Die Beständigkeit von CBZ über diesen Zeitraum ist in verschiedenen Studien belegt worden. Vanderford et al. untersuchten den Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen auf die Stabilität von 21 Spurenstoffen [287]. CBZ war dabei sowohl bei 4°C als auch bei Raumtemperatur unabhängig vom Gefäßmaterial und von chemischen Stabilisatoren über den gesamten untersuchten Zeitraum von 28 Tagen stabil (<15 % Verlust). Dieser gegenüber der ungekühlten Lagerung höhere Abbau wurde nicht erklärt, er wurde aber auch bei anderen Substanzen wie Sulfamethoxazol und Meprobamat festgestellt. Lediglich Einfrieren bei -20°C führte zu einem Verlust von mehr als 20 %. Auch Yu et al. konnten bei 9-tägiger Lagerung der Proben bei Raumtemperatur keinen signifikanten Abbau feststellen [288]. Eigene Untersuchungen (nicht gezeigt) bestätigten die chemische Beständigkeit von CBZ in Gewässerproben über einen Zeitraum von mindestens vier Wochen.

### 3.8.2 Probenvorbereitung

Für die ELISA-Analyse wurden die Wasserproben nicht weiter aufbereitet. Vor der Analyse wurden die Proben im Kühlschrank gelagert, so dass in der Regel der Großteil der Schwebstoffe zum Analysenzeitpunkt auf den Boden gesunken war. Der Überstand wurde dann analysiert.

Bei der Analyse mit LC-MS/MS wurden die Proben entweder ohne Anreicherung oder nach Festphasenanreicherung gemessen. Bei direkter Messung wurden die Proben aus dem Klärwerkszulauf wegen des hohen Verschmutzungsgrades zunächst 5 Minuten bei 25000 g

zentrifugiert, alle übrigen Proben wurden ohne Zentrifugation analysiert. Danach wurde je 1 g der Probe mit 50 mg einer wässrigen Lösung der internen Standards  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -CBZ und Cetirizin- $\text{d}_8$  ( $c = 0,5 \mu\text{g/g}$ ) versetzt. Die Masse der Probe wurde dabei vor und nach Zugabe des Standards mit einer Analysenwaage gemessen. Aus der Massendifferenz wurde die genaue Konzentration des internen Standards berechnet. Vor der Injektion in den Flüssigchromatographen wurden die Proben mit einer Polyethylen-Spritze aufgezogen und durch einen Spritzenvorsatzfilter (Glasfaser;  $1,3 \mu\text{m}$ ; Whatman) filtriert.

### 3.9 Methodik der Literaturlauswertung

In Kapitel 2.2.1 sind die Ergebnisse einer Literaturstudie über die Verbreitung von CBZ in Abwässern und Oberflächengewässern enthalten. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse war mit besonderen Schwierigkeiten verbunden, da die Messwerte in den untersuchten 126 Veröffentlichungen sehr uneinheitlich dargestellt wurden. In einigen Fällen wurde der Mittelwert, in anderen der Median aller Messwerte gezeigt. Einige Autoren beschränkten sich auf die Spannweite der Messwerte. In mehreren Fällen wurde für Teilmengen (z. B. einzelne Gewässer) ein Mittelwert oder Median angegeben. In manchen Fällen wurde ausschließlich die Überschreitung eines Schwellenwertes berichtet.

Für die Zusammenfassung in Tabelle 3 wurde der Median aller für das entsprechende Land vorliegenden Studienergebnisse berechnet. Tabelle 31 (s. Anhang) zeigt die Einzelnachweise aller Quellen mit Angabe der Art des Studienergebnisses. Als Studienergebnis wurde wenn möglich der Median aller Messwerte verwendet und bei Nichtvorliegen eines Medians der Mittelwert. Bei Vorliegen einer Spannweite wurde der Mittelwert aus Obergrenze und Untergrenze gebildet. Lagen Mittelwerte oder Mediane von Teilmengen vor, wurde der Median aus diesen Werten gebildet. Wurde in der Studie nur die Überschreitung oder Unterschreitung eines Schwellenwertes berichtet, blieb dies für die Berechnung des Medians in Tabelle 3 unberücksichtigt.

Als Gesamtanzahl aller Proben wurde die Summe aller Messungen in den betreffenden Studien berechnet. Wenn unvollständige oder gar keine Angaben hierzu vorlagen, wurde der Gesamtanzahl das Zeichen „>“ (größer als) vorangestellt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kopplung von Carbamazepin an Meerrettichperoxidase

Zur Etablierung eines kompetitiven, direkten ELISAs wird neben einem geeigneten Antikörper auch ein Enzymkonjugat benötigt. Dieses Konjugat wird vom Antikörper selektiv gebunden und sorgt für die Signalerzeugung. Während der CBZ-spezifische Antikörper kommerziell erhältlich war, musste das Konjugat synthetisiert werden.

Der Tracer wurde durch die Kopplung des Analyten CBZ an das Enzym HRP hergestellt. Diese Kopplung kann auf verschiedene Weisen erfolgen. In der Regel führt die Herstellung eines homologen Tracers, der auf gleiche Weise wie das Immunogen hergestellt wurde, zu einem gut bindenden Tracer. Zur Struktur des Immunogens waren auch auf explizite Nachfrage bei der Bezugsquelle keine Informationen zu bekommen. Häufig wird zwischen Enzym und Hapten ein mehratomiges Bindeglied (Spacer) eingefügt, um die Bindungsstelle für die Bindung an den Antikörper leichter zugänglich zu machen. Daher wurden zwei verschiedene Tracer synthetisiert und getestet — einer mit und einer ohne Spacer.

#### 4.1.1 Synthese eines Tracers ohne Spacer (CBZ-HRP)

Als Edukt für die Kopplung von CBZ an ein Protein bietet sich das kommerziell erhältliche Säurechlorid von CBZ an. Die Schwierigkeit des einstufigen Syntheseansatzes (s. Abbildung 16) liegt in der Wahl der Reaktionsbedingungen. Bei Kontakt mit organischen Lösungsmitteln verliert Peroxidase rasch an enzymatischer Aktivität. Das Säurechlorid hingegen ist in reinem Wasser schwer löslich und reagiert überdies mit Wasser zur Carbonsäure. Diese Nebenreaktion ist umso mehr begünstigt, da die Kopplung an die Amingruppen des Enzyms einen basischen pH-Wert erfordert.

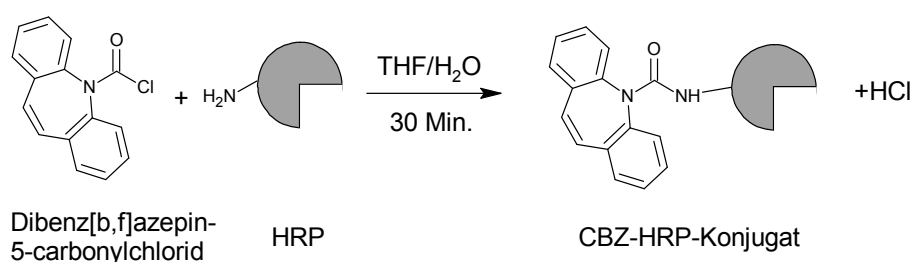


Abbildung 16: Tracersynthese ohne Spacer.

Es wurden verschiedene Syntheseansätze ausprobiert. Dabei wurden der Anteil an organischem Lösungsmittel, die Konzentrationen der Reaktanden sowie die Synthesedauer systematisch variiert. Die besten Ergebnisse hinsichtlich der erzielten ELISA-Signalhöhe wurden unter 500-fachem Überschuss von Säurechlorid in einem THF-Wasser-Gemisch (50 % v/v) erreicht. Dieser Überschuss stellte dabei annähernd die Sättigungskonzentration des Säurechlorids dar. Bei einer Reaktionsdauer von 30 Minuten blieb die Aktivität der Peroxidase unter den gewählten Bedingungen zumindest teilweise erhalten, so dass der

anschließende Einsatz dieses Tracers im ELISA erfolgreich verlief. Hierzu waren jedoch sehr hohe Konzentrationen des Tracers erforderlich (s. Abbildung 17).

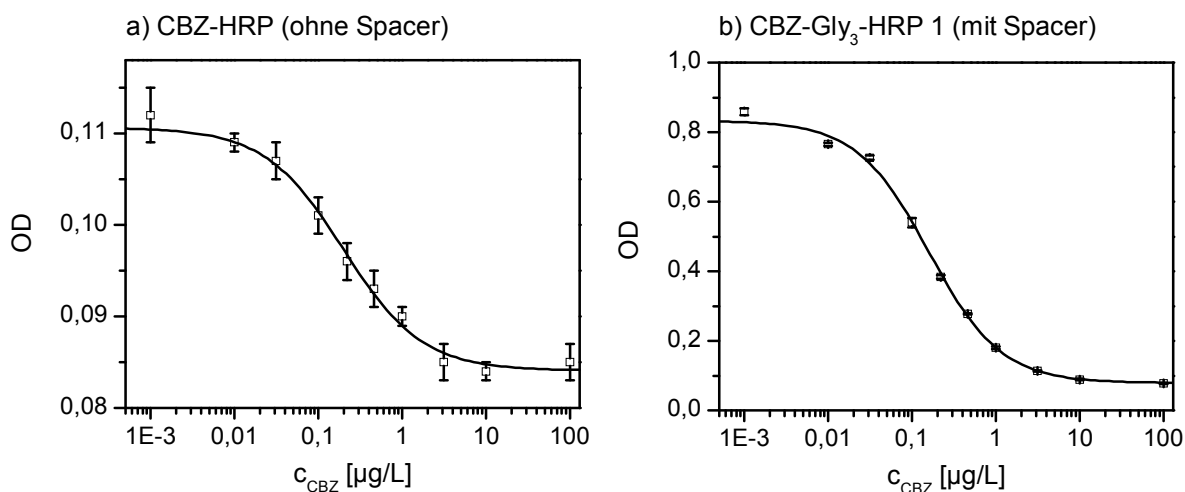


Abbildung 17: ELISA-Kalibrierkurven bei Verwendung der Tracer CBZ-HRP und CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 1. Durchführung des ELISAs auf derselben Platte bei pH 7,6; ELISA-Methode A wurde leicht abgewandelt: a)  $c(\text{prim. AK}) = 2,3 \text{ nmol/L}$ ,  $c(\text{Tracer}) = 24 \text{ nmol/L}$ ;  $A = 0,11$ ;  $B = 0,94$ ;  $C = 0,19$ ;  $D = 0,084$ . b)  $c(\text{prim. AK}) = 0,45 \text{ nmol/L}$ ,  $c(\text{Tracer}) = 1,7 \text{ nmol/L}$ ;  $A = 0,83$ ;  $B = 1,01$ ;  $C = 0,16$ ;  $D = 0,079$ .

#### 4.1.2 Synthese eines Tracers mit dem Spacer Triglycin (CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP)

##### Herstellung des Haptens

Das Hapten CBZ-Triglycin wurde durch eine Umsetzung von Dibenz[b,f]azepin-5-carbonylchlorid mit Triglycin in wässriger THF-Lösung hergestellt (s. Abbildung 18). Dabei reagierten 19 % des Triglycins mit dem im 3-fachen Überschuss vorhandenen Säurechlorid. Diese Ausbeute kann als relativ hoch angesehen werden, da das Säurechlorid ebenfalls mit dem in ca. 2000-fach höherer Molarität vorliegendem Wasser reagieren kann. Daraus lässt sich folgern, dass das eingesetzte Säurechlorid relativ unreaktiv ist. Es steht damit im Gegensatz zu vielen anderen Säurechloriden (z. B. Essigsäurechlorid), die häufig sehr heftig mit Wasser reagieren.

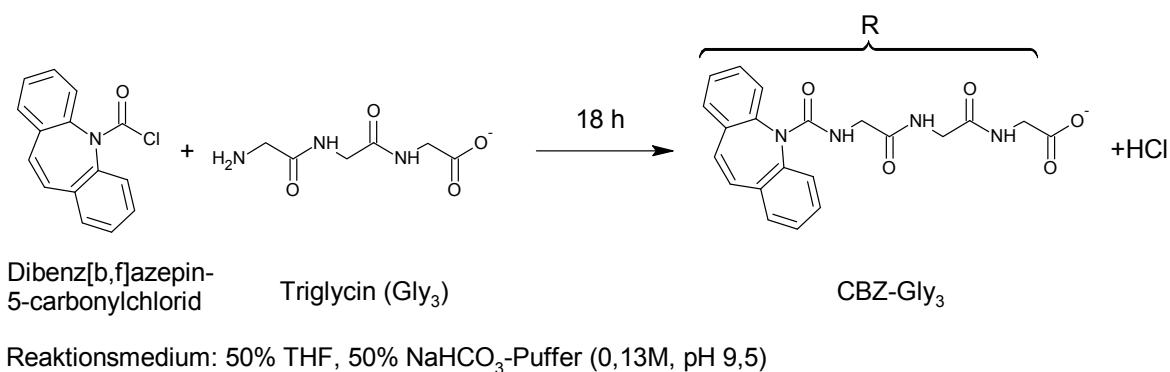


Abbildung 18: Synthese des Haptens.

Als Hauptnebenprodukt wurde Iminostilben identifiziert, das nach Hydrolyse und Dekomposition des Säurechlorids entstand. Das Hapten lag nach Ausfällung und Waschen mit verdünnter Salzsäure in hoher Reinheit vor (>99 %, s. Abbildung 61).

### Aktivierung des Haptens

Um die Kopplung von Hapten und HRP einzuleiten, wurde das Hapten zunächst mit NHS verestert (s. Abbildung 19). Diese Reaktion ließ sich durch Zugabe von DCC beschleunigen. Hierbei entstand zunächst ein hochreaktiver DCC-Ester, der zum CBZ-Gly<sub>3</sub>-NHS-Ester weiterreagierte. Als Nebenprodukt entstand der Feststoff Dicyclohexylharnstoff (DCU), der durch Zentrifugation entfernt wurde.

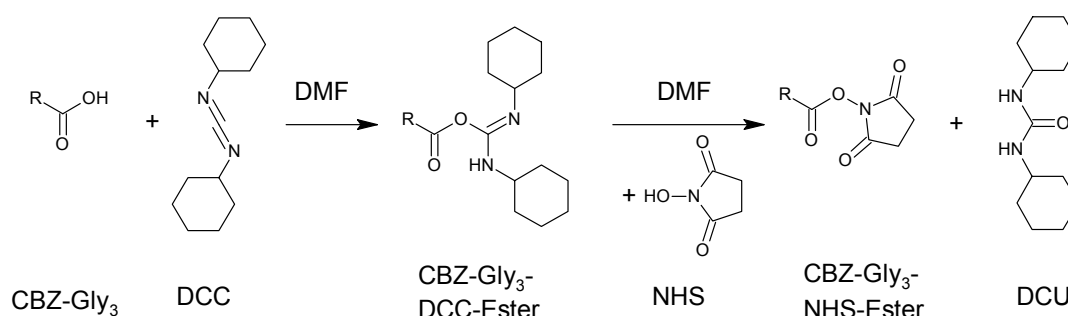


Abbildung 19: Aktivierung des Haptens zum NHS-Ester (R: s. Abbildung 18).

### Kopplung an das Enzym

Der aktivierte CBZ-Gly<sub>3</sub>-NHS-Ester reagierte spontan mit den Lysin-Resten der Peroxidase (s. Abbildung 20). Auf Anhieb gelang dabei ein Tracer, der in geringeren Konzentrationen wesentlich höhere Signale im ELISA erlaubte als das Konjugat ohne Spacer CBZ-HRP (s. Abbildung 17). Nach diesem Prinzip wurden vier weitere Enzymkonjugate hergestellt, die sich in der Anzahl der pro Enzym gebundenen CBZ-Einheiten unterschieden.

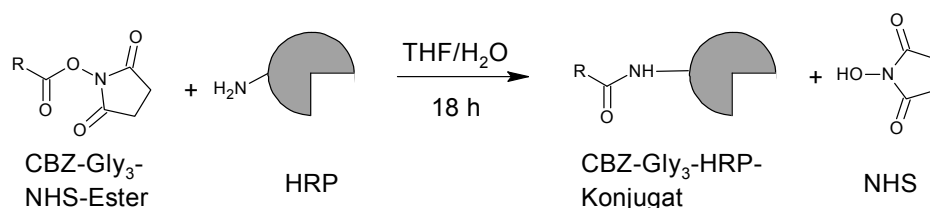


Abbildung 20: Reaktion des NHS-Esters mit Meerrettichperoxidase (R: s. Abbildung 18).

## 4.2 Charakterisierung der Enzymkonjugate

Die Enzymkonjugate wurden mit MALDI-TOF-MS und UV/VIS-Spektroskopie charakterisiert, um die Kopplungsdichte zu ermitteln, d.h. die Anzahl der pro Enzym gebundenen Hapteneinheiten. Der Funktionstest erfolgte im ELISA.



## 4.2.1 MALDI-TOF-MS

Durch die Kopplung von Hapten und Peroxidase vergrößerte sich die Masse des entstandenen Proteins. Eine Analyse mit MALDI-TOF-MS ermöglichte die Bestimmung der Proteinmasse und somit, die Anzahl der gebundenen Haptene pro Peroxidaseeinheit abzuschätzen.

Das Massenspektrum von ungekoppelter Peroxidase (s. Abbildung 21) zeigte mehrere Peaks. Alle Peaks ließen sich der Meerrettichperoxidase zuordnen, die eine Molmasse von etwa  $44000 \text{ g mol}^{-1}$  besitzt [289]. Neben dem größten Peak bei ca. 44 kDa ließen sich auch die Signale von Dimeren und Trimeren bei 88 kDa bzw. 132 kDa sowie die Signale mehrfach geladener Spezies zuordnen. Das Fehlen weiterer Peaks lässt darauf schließen, dass die verwendete Peroxidase nicht nennenswert durch Proteine verunreinigt ist. Hierfür spricht auch die per UV/VIS-Spektroskopie gemessene Reinheitszahl von 3,3, die für das Isoenzym C idealerweise bei 3,4 liegt [290].

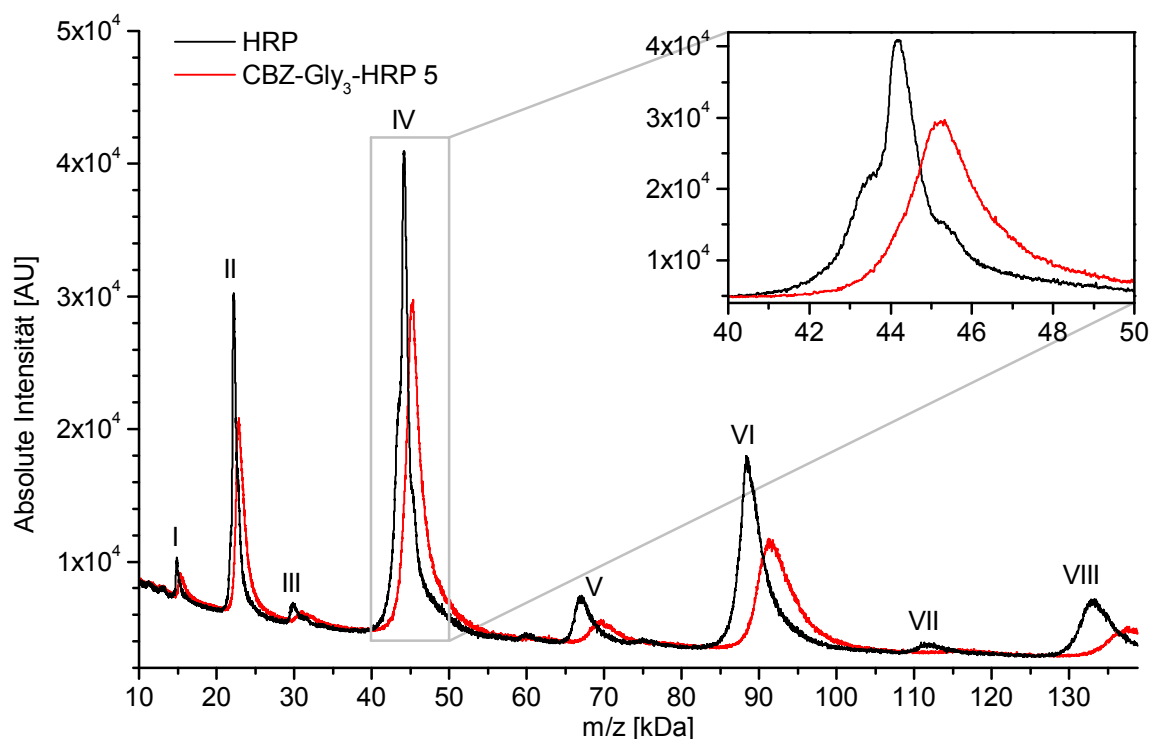


Abbildung 21: MALDI-TOF-MS-Spektrum von ungekoppelter HRP und dem Konjugat CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 5. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 11 bzw. 13 Einzelspektren. Peakzuordnung: I:[M-H]<sup>3+</sup>; II:[M-H]<sup>2+</sup>; III:[M<sub>2</sub>-H]<sup>3+</sup>; IV:[M-H]<sup>+</sup>; V:[M<sub>3</sub>-H]<sup>2+</sup>; VI:[M<sub>2</sub>-H]<sup>+</sup>; VII:[M<sub>5</sub>-H]<sup>2+</sup>; VIII:[M<sub>3</sub>-H]<sup>+</sup>

Der Quasimolekülionenpeak weist bei genauerer Betrachtung zu beiden Seiten Schultern auf. Natürlich gewonnene Peroxidase ist von recht heterogener Natur und kann in mindestens 15 verschiedenen Isoformen auftreten [283]. Laut Herstellerangaben bestand die in dieser Arbeit verwendete Peroxidase zu mindestens 90 % aus der Isoform HRP C. Diese Isoform ist ein Glykoprotein und besitzt neun potentielle Bindungsstellen für Kohlenhydrate, von denen acht üblicherweise belegt sind [289, 291]. Die Natur der gebundenen Kohlenhydrate kann dabei stark variieren [283, 292]. Für den Anteil der Kohlenhydrate an der Gesamtmasse des Enzyms sind Werte zwischen 18 und 22 % (w/w)

beschrieben worden [289, 293, 294]. Diese Diversität ist vermutlich für die auftretenden Schultern im Massenspektrum verantwortlich. Ähnliche Peakformen sind auch in anderen Arbeiten dokumentiert worden [295, 296].

Das Massenspektrum des Enzymkonjugats ist gegenüber der Ausgangssubstanz deutlich zu höheren Massen verschoben. Zusätzlich ist der Peak verbreitert und zeigt im Gegensatz zu Peroxidase keine Schultern. Die Peakverbreiterung ist auf das gleichzeitige Vorliegen von unkonjugierten sowie einfach und mehrfach konjugierten Proteinspezies zurückzuführen.

Der Mittelpunkt einer an den Quasimolekülionenpeak angepassten Lorentz-Funktion ergab näherungsweise die mittlere Masse des Proteins. Insgesamt wurden die Massen von sechs verschiedenen Proteinkonjugaten bestimmt (s. Tabelle 12). Aus der Differenz zur Masse der unkonjugierten Peroxidase ließ sich die Kopplungsdichte berechnen. Die Massen von Konjugat und HRP-Referenz wurden dabei am gleichen Tag gemessen, um geräteabhängige Schwankungen zu minimieren. Es ergaben sich Kopplungsdichten zwischen 0,3 und 3,0. Diese Werte sind als plausibel zu bewerten, da unter den gewählten milden Reaktionsbedingungen vier Lysinreste für die Kopplung zugänglich sind [297]. Die berechneten Kopplungsdichten waren genau wie die ermittelten Proteinmassen aufgrund der breiten und asymmetrischen Massenpeaks mit einer erheblichen Unsicherheit behaftet. Dies traf insbesondere für CBZ-HRP und CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 2 zu, da hier der Massenunterschied besonders klein war.

*Tabelle 12: Mit MALDI-TOF-MS bestimmte Massen der Proteinkonjugate aus Meerrettichperoxidase und CBZ. Die HRP-Referenzmessung wurde am selben Tag unter gleichen Messbedingungen anhand von ungekoppelter Peroxidase durchgeführt. Die Kopplungsdichte ergibt sich aus der Differenz der Masse des Konjugats und der HRP-Referenz, geteilt durch die Haptenmasse.*

Bezeichnung des Tracers	Herstellungsdatum	Masse [Da]	Masse der HRP-Referenz [Da]	Kopplungsdichte
CBZ-HRP	07.03.2008	44770	44640	0,6
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 1	12.03.2008	45540	44640	2,3
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 2	04.06.2008	44460	44340	0,3
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 3	04.06.2008	44720	44340	1,0
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 4	04.06.2008	45000	44340	1,7
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 5	25.03.2010	45370	44200	3,0

#### 4.2.2 UV/VIS Spektroskopie

Bedingt durch die Hämgruppe besitzt Peroxidase im sichtbaren Bereich charakteristische Absorptionsbanden bei 403 nm (Soret-Bande), 498 nm und 640 nm. Gegenüber HRP zeigten die UV/VIS-Spektren der Enzymkonjugate im Wellenlängenbereich zwischen 240 und 320 nm eine zusätzliche Bande (s. Abbildung 22a). Dies ist auf die Konjugation mit dem Hapten zurückzuführen, das wie CBZ eine Absorptionsbande bei 285 nm besitzt.

Die Differenz aus dem Spektrum des Konjugats und dem Spektrum von HRP zeigte dementsprechend für die meisten Konjugate einen annähernd identischen Verlauf wie das Spektrum des Haptens CBZ-Triglycin (s. Abbildung 22b). Lediglich CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 1 zeigte ein deutlich abweichendes Differenzspektrum. Als Erklärung mag dienen, dass nur bei diesem Konjugat auf die Reinigung des Haptens verzichtet wurde. Es ist denkbar, dass

während der Kopplung dieses ungereinigten Haptens andere in der Reaktionslösung vorhandene Substanzen an die Peroxidase gebunden wurden. Ebenfalls denkbar ist, dass sich während der Tracersynthese die Hämgruppe partiell abspaltete. Die Hämgruppe ist vergleichsweise leicht abspaltbar, da sie nicht kovalent gebunden ist. Sie lässt sich beispielsweise durch 0,2 molare Salzsäure extrahieren [282]. In der Konsequenz sinkt die Absorption im sichtbaren Bereich unter Beibehaltung der Banden im ultravioletten Bereich. Daher wäre — relativ zur Soret-Bande — eine erhöhte Absorption im ultravioletten Bereich zu beobachten.

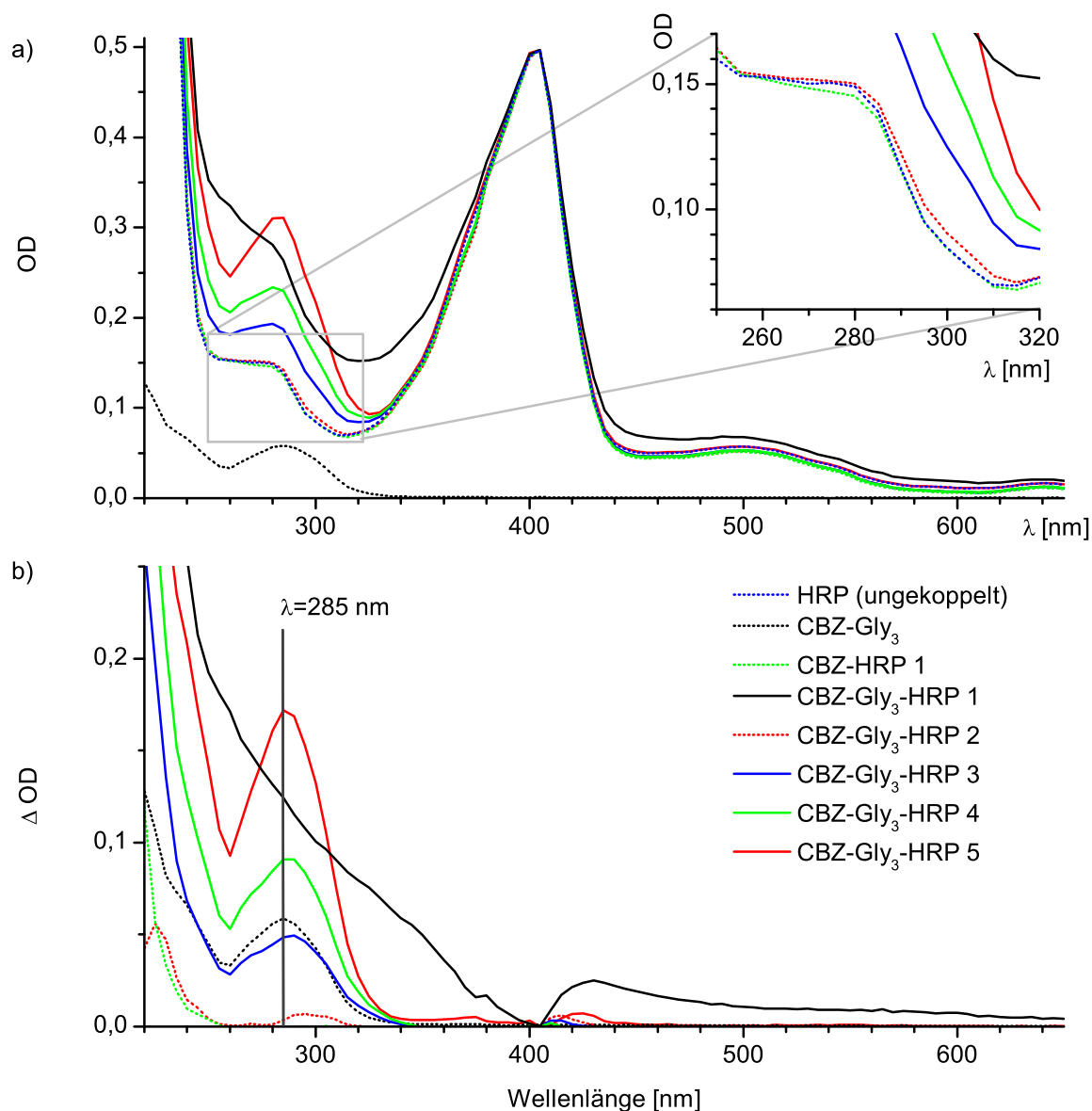


Abbildung 22: a) UV/VIS-Spektren von ungekoppelter HRP, verschiedener Enzymkonjugate und dem Hapten CBZ-Gly<sub>3</sub>. Spektren von CBZ-Gly<sub>3</sub> und HRP wurden bei identischer Konzentration aufgenommen (21,8  $\mu\text{mol/L}$ ), die Enzymkonjugate wurden annähernd auf diese Konzentration verdünnt, die erhaltenen Spektren wurden anschließend anhand der Soret-Bande bei 405 nm an die HRP-Kurve angepasst. b) Spektren der Enzymkonjugate nach Differenzbildung mit dem Spektrum von ungekoppelter HRP, zum Vergleich mit dem Spektrum von CBZ-Gly<sub>3</sub>. Bestimmung der Kopplungsdichte anhand des Verhältnisses der Absorptionen von Enzymkonjugat und Hapten bei 285 nm.

Unter der Annahme, dass die Absorption dem Lambert-Beerschen Gesetz folgt, lässt sich die Kopplungsdichte durch den Vergleich des Differenzspektrums aus Konjugat und HRP mit dem Spektrum des Haptens abschätzen. Hierzu wurde beim Absorptionsmaximum bei 285 nm die Differenz der Absorption in Relation zur Absorption des Haptens gesetzt. Ähnlich wie mit der massenspektrometrischen Methode ergaben sich für die Konjugate Kopplungsdichten von bis zu 2,9 (s. Tabelle 13).

Für CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 1 ergab sich rechnerisch eine Kopplungsdichte von 2,1. Dieser Wert ist offensichtlich falsch, da wie bereits erwähnt das Differenzspektrum nicht mit dem Spektrum des Haptens übereinstimmte. Dass die tatsächliche Kopplungsdichte dieses Konjugats wahrscheinlich wesentlich niedriger lag, zeigt das folgende Kapitel.

Tabelle 13: Kopplungsdichten der Enzymkonjugate, bestimmt anhand der UV-Absorption bei 285nm.

Bezeichnung	Kopplungsdichte (Ratio OD <sub>285nm</sub> )	MALD-TOF-MS
CBZ-HRP	-0,05	0,6
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 1	(2,1)	2,3
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 2	0,1	0,3
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 3	0,8	1,0
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 4	1,6	1,7
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 5	2,9	3,0

#### 4.2.3 Einfluss der Kopplungsdichte des Enzymkonjugats auf den ELISA

Als entscheidende Qualitätsmerkmale für einen ELISA wurden die erzielte Signalhöhe und die Lage des Testmittelpunktes für die Beurteilung der synthetisierten Tracer herangezogen. Beim Vergleich der verschiedenen Tracer zeigte sich sehr schnell, dass bei gleichen Randbedingungen mit allen Tracern näherungsweise derselbe Testmittelpunkt und die gleiche Signalintensität erreicht werden konnte. Unterschiede zwischen den Tracern bestanden nur in der erforderlichen Tracerkonzentration. Selbst der sehr schwach bindende Tracer CBZ-HRP ermöglichte annähernd denselben Testmittelpunkt wie die übrigen Tracer, wobei hierzu neben einer deutlichen Erhöhung der Tracerkonzentration auch eine leichte Erhöhung der Antikörperkonzentration nötig war (s. Abbildung 17).

Die Tracer waren also qualitativ gleichwertig, aber unterschiedlich ergiebig. Um die Tracer zu vergleichen, wurde daher die Ergiebigkeit  $E$  als Quotient aus der Signalstärke ( $A$ -Wert), abzüglich des Hintergrundsignals ( $D$ -Wert), und der Peroxidasekonzentration  $c$  definiert:

$$E = \frac{A - D}{c} \quad (17)$$

Die Tracer CBZ-HRP und CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 2 besaßen die geringsten Kopplungsdichten und zeigten dabei auch geringe Ergiebigkeiten (s. Tabelle 14). Dieser Zusammenhang ist plausibel, da die gemessene Kopplungsdichte unter 1 bedeutet, dass ein Teil der Peroxidase ungekoppelt geblieben und somit nicht als Tracer nutzbar ist. Bei sehr hohen Kopplungsdichten waren hingegen keine Unterschiede sichtbar: CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 5 besaß etwa dieselbe Ergiebigkeit wie CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 4, obwohl die Kopplungsdichte mit ca. 3

ungefähr doppelt so hoch war. Das Vorhandensein mehrerer Bindungsstellen am Tracer hat also keinen messbaren Effekt auf die Bindung an den Antikörper.

Eine hohe Kopplungsdichte kann die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Ligandenbindung erhöhen, so dass die Reaktion von der kinetischen Seite begünstigt werden sollte. Das Reaktionsgleichgewicht dagegen sollte von der Kopplungsdichte nicht beeinflusst werden, solange die Kopplungsdichte Werte über Eins annimmt und jeder Tracer nur von einem Antikörper gebunden werden kann. Das nahezu identische Verhalten der Tracer CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 4 und CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 5 ist ein Indiz dafür, dass die Ligandenbindungsreaktion im Gleichgewicht steht und kinetische Aspekte nicht von entscheidender Bedeutung sind.

*Tabelle 14: Ergiebigkeit der Tracer wurde unter gleichen Bedingungen und bei ähnlicher OD (0,4-0,8) im ELISA gemessen; Werte sind relativ zur höchsten Ergiebigkeit; Ergiebigkeit von CBZ-HRP war sehr klein und konnte nur bei erhöhter Konzentration des primären Antikörpers abgeschätzt werden.*

Bezeichnung des Tracers	Relative Ergiebigkeit	Kopplungsdichte	
		MALD-TOF-MS	Ratio OD <sub>285nm</sub>
CBZ-HRP	< 0,001 %	0,6	-0,05
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 1	0,6 %	2,3	(2,1)
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 2	10 %	0,3	0,1
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 3	43 %	1,0	0,8
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 4	100 %	1,7	1,6
CBZ-Gly <sub>3</sub> -HRP 5	97 %	3,0	2,9

Eine Sonderstellung unter den untersuchten Tracern nahm CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 1 ein, das eine sehr geringe Ergiebigkeit bei scheinbar hoher Kopplungsdichte zeigte. Offenbar wurde die Kopplungsdichte überschätzt. Dies deutet auf die unerwünschte Kopplung anderer Moleküle (z. B. verbliebenes Triglycin aus der vorangegangenen Bildungsreaktion des Haptens) statt des Haptens an die Peroxidase hin. Das abweichende UV/VIS-Spektrum stützt diese Hypothese (s. vorheriges Kapitel). Eine andere mögliche Erklärung für die geringe Ergiebigkeit dieses Konjugats wäre, dass durch zu harsche Reaktionsbedingungen die Enzymaktivität verringert wurde, zum Beispiel durch Entfernung der vergleichsweise leicht abspaltbaren Hämgruppe. Dieser Fall ist weniger wahrscheinlich, da dann die Antikörper-Antigen-Bindung unbeeinflusst geblieben wäre. Aufgrund der erhöhten Tracerkonzentration wäre ein höherer Testmittelpunkt zu erwarten gewesen.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass der Einfluss der Kopplungsdichte auf den ELISA gering war. Die Kopplungsdichte sollte aus Effizienzgründen möglichst hoch sein, aber auch geringe Kopplungsdichten unterhalb von Eins sind bei erhöhtem Substanzeinsatz problemlos vertretbar. Eine ähnliche Schlussfolgerung wurde von Carvalho für einen Koffein-ELISA gezogen [298].

Die Bestimmung der Kopplungsdichte sollte wenn möglich nicht ausschließlich mit MALDI-TOF-MS erfolgen, da hiermit keine Aussagen über die Art des gekoppelten Restes möglich sind. Bei Substanzen mit charakteristischem UV-Spektrum kann die UV/VIS-Spektroskopie sehr aufschlussreich sein. Mit ihr wurden annähernd dieselben Kopplungsdichten wie mit MALDI-TOF-MS bestimmt. Zusätzlich offenbarte diese Methode Unregelmäßigkeiten bei Tracer CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 1, wie im vorherigen Kapitel erläutert.

## 4.3 Entwicklung des CBZ-ELISAs

Zunächst wurde aufbauend auf Erfahrungswerten eine funktionsfähige ELISA-Prozedur entworfen. Diese wurde nachfolgend mit dem Ziel optimiert, eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen. Dies wurde hauptsächlich durch die Verringerung des Testmittelpunktes der ELISA-Kalibrierkurve erreicht. Als Rahmenbedingung wurde die zu messende OD auf den Bereich zwischen 0,5 und 1 festgesetzt, bei der im ELISA erfahrungsgemäß ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht wird. Die Messung im ELISA ist zwar auch bei deutlich niedrigeren Extinktionen durchführbar, häufig geht dies aber zu Lasten der Signalqualität (s. Abbildung 17).

Darüber hinaus wurde darauf geachtet, den Kostenvorteil des Immunoassays gegenüber Konkurrenzmethoden nicht zu verlieren. Zum Teil wurden leichte Abstriche bei Sensitivität und/oder Signalstärke in Kauf genommen, wenn hierdurch eine deutliche Kostenersparnis erzielt werden konnte. Die für die Durchführung benötigte Zeit wurde ebenfalls möglichst kurz gehalten, allerdings nur sofern sich hierdurch keine gravierenden Nachteile ergaben.

Einen Überblick über die variierten Parameter und eine qualitative Abschätzung für die Bedeutung hinsichtlich Sensitivität, Signalstärke und Kosten zeigt Tabelle 16. Die Parameter wurden - wenn nicht anders erwähnt - nacheinander und isoliert optimiert, und zwar in der Reihenfolge wie in der Tabelle angegeben. Eine detaillierte Diskussion findet sich in den folgenden Kapiteln.

### 4.3.1 Stationäre Phase

Es sind zahlreiche verschiedene Mikrotiterplatten für den Einsatz in Immunoassays auf dem Markt. Zu den wichtigsten Herstellern zählen Nunc und Greiner, aus deren Sortiment insgesamt drei Platten getestet wurden.

Alle getesteten Platten bestanden vollständig aus Polystyrol. Bei einigen Modellen wurde die Oberfläche durch ein physikalisches Verfahren behandelt, um die Bindungskapazität zu erhöhen. Die so behandelten Platten der Marke Nunc tragen die Zusatzbezeichnung „Maxisorp“, bei Greiner „Microlon 600“.

*Tabelle 15: Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten im ELISA.*

	Nunc Maxisorp	Greiner Microlon	Nunc (unbehandelt)
Geometrie	C96	F96	F96
A-Wert	1,27	1,20	0,68
Preis pro Stück incl. MwSt.	2 €	1,20 €	0,80 €

Tabelle 16: Optimierte Parameter und ihr Einfluss auf Sensitivität, Signalstärke und Kosten des ELISAs.

Arbeitsschritt	Parameter	Optimierte Größe	Außerdem getestet und verworfen	Einfluss auf		
				C-Wert	A-Wert	Kosten
Stationäre Phase	Hersteller	Greiner F96	Nunc Maxisorp C96; Nunc non-treated F96	0	+	++
Sekundärer AK	Hersteller	Acris R1612P	Acris R1256P; Acris R1253P; Sigma M5899	0	++	+
	AK-Konzentration	1 mg/L	0,25 mg/L; 0,5 mg/L; 2 mg/L; 4 mg/L	0	++	++
	Inkubationszeit	1h-22h	10 min, 30 min; 1 h; 2 h; 3 h; 22 h	0	+	0
	pH-Wert des Puffers	7,6	4,5; 5,5; 6,5; 8,5; 9,5	n.g.	0	0
Primärer AK	Hersteller	Biodesign (monoklonal)	ARP (monoklonal)	++	++	+
	AK-Konzentration	57 pmol/L	1,3-8600 pmol/L	++	++	+
	Inkubationszeit	1h	15 min, 3 h	n.g.	+	0
	pH-Wert des Puffers	7,6	4,5; 5,5; 6,5; 8,5; 9,5	n.g.	++	0
Ligandenbindung	Tracerkonzentration	30 pmol/L*	0,4-15000 pmol/L	++	++	0
	Reihenfolge der Zugabe Tracer und Probe	vongleichzeitig	Vorinkubation des Tracers (10, 20, 30 min), Vorinkubation der Probe (10, 20, 30 min)	0	+	0
	Inkubationszeit	30 min	5 min, 15 min, 45 min, 180 min	+	+	0
	Puffer, pH-Wert	10,5	4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 7,6; 8,5; 9,5	+	+	0
	Puffer, Salzkonzentration	3 M	0; 0,16; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 M	0	++	0
	Kopplungsdichte des Tracers	3,0	0,3; 1,0; 1,7	0	+	0
	Puffer, Zusätze	EDTA	1 % BSA, Tween	0	0	0

n.g.: nicht getestet    0: kein signifikanter Einfluss    +: geringer bis moderater Einfluss    ++: großer Einfluss

\*Endkonzentration in der Reaktionsmischung nach Vereinigung von Probe und Konjugatlösung



Alle drei Platten waren für den ELISA geeignet und ermöglichten eine gut auswertbare Kalibrierkurve. Bei den erzielten Signalthöhen schnitt die unbehandelte Platte von Nunc deutlich schlechter ab als die beiden behandelten, die in etwa dieselbe Signalthöhe zeigten (Tabelle 15). Die Testmittelpunkte waren dagegen bei allen drei Platten im Rahmen der Schwankungsbreite identisch. Die Plattenhomogenität wurde durch einen ELISA mit 96 gleich beschickten Kavitäten überprüft, deren Variationskoeffizient in allen Fällen zwischen 3 und 4 % lag.

Beide oberflächenmodifizierten Platten zeigten in etwa gleichwertige Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Platten verwendet, wobei die Platte von Greiner aufgrund des um 40 % geringeren Preises häufiger zum Einsatz kam.

### 4.3.2 Immobilisierung der Antikörper

#### *Sekundärer Antikörper*

Es wurden vier sekundäre, polyklonale Antikörper getestet (s. Tabelle 17), die sich in ihrer Reinheit, dem zugrundeliegenden Immunogen sowie der Wirtsspezies unterschieden. Die drei affinitätschromatographisch aufgereinigten Antikörper des Herstellers Acris führten zu ähnlichen, sehr hohen Signalstärken, während das Vollserum von Sigma-Aldrich auch bei sehr hohen Konzentrationen ca. 70 % weniger Signal lieferte. Die drei Antikörper von Acris ergaben trotz zum Teil unterschiedlicher Epitope und Wirtsspezies annähernd dasselbe Signal. Für die Wahl des Antikörpers war demnach vor allem die Reinheit des Antikörpers entscheidend. Bei einem gereinigten Antikörper werden keine Bindungsplätze auf der Platte von Serumbestandteilen blockiert, so dass der gesamte Platz für die Antikörper zur Verfügung steht. Im Wesentlichen entspricht dies den Ergebnissen von Kull [299]. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weitere Arbeit einer der sekundären Antikörper von Acris (R1612P) ausgewählt.

*Tabelle 17: Übersicht der untersuchten sekundären Antikörper.*

Antikörper	Wirt	Epitop
Acris R1612P	Ziege	Maus IgG (nur Fc-Fragment)
Acris R1256P	Schaf	Maus IgG (vollständiges Molekül)
Acris R1253P	Kaninchen	Maus IgG (vollständiges Molekül)
Sigma-Aldrich M5899	Ziege	Maus IgG (vollständiges Molekül)

Die optimale Konzentration des sekundären Antikörpers wurde experimentell mit 1 mg/L ermittelt, was annähernd die Sättigungskonzentration ist (s. Abbildung 23). Eine Verdoppelung auf 2 mg/L führte zu weniger als 10 % Signalgewinn. Da der sekundäre Antikörper einen bedeutenden Posten bei den Gesamtkosten darstellt, wurde auf diesen Signalgewinn verzichtet. Geringere Konzentrationen als 1 mg/L führten rasch zu geringerem Signal, bei 0,25 mg/L betrug der Signalverlust 60 %.

Die Oberfläche der Maxisorp-Mikrotiterplatten bietet laut Herstellerangaben bei einem Füllvolumen von 200 µL genügend Platz für die Bindung von 200-1000 ng IgG [300]. Für eine Absättigung wäre dementsprechend wenigstens eine Antikörperkonzentration von



1-5 mg/L erforderlich, was in derselben Größenordnung wie der experimentell ermittelte Wert liegt.

Der Antikörper band bei Raumtemperatur rasch an die feste Phase. Bereits nach zehn Minuten Inkubationszeit waren 70 % der Bindungsstellen besetzt und nach zwei Stunden 90 %. Das höchste Signal wurde bei einer Inkubation von 18 Stunden erreicht.

Der pH-Wert war für den Erfolg der Beschichtung von geringer Bedeutung: Die erzielte Signalstärke war für den gesamten untersuchten pH-Bereich von 4,5 bis 9,5 gleichermaßen gut.

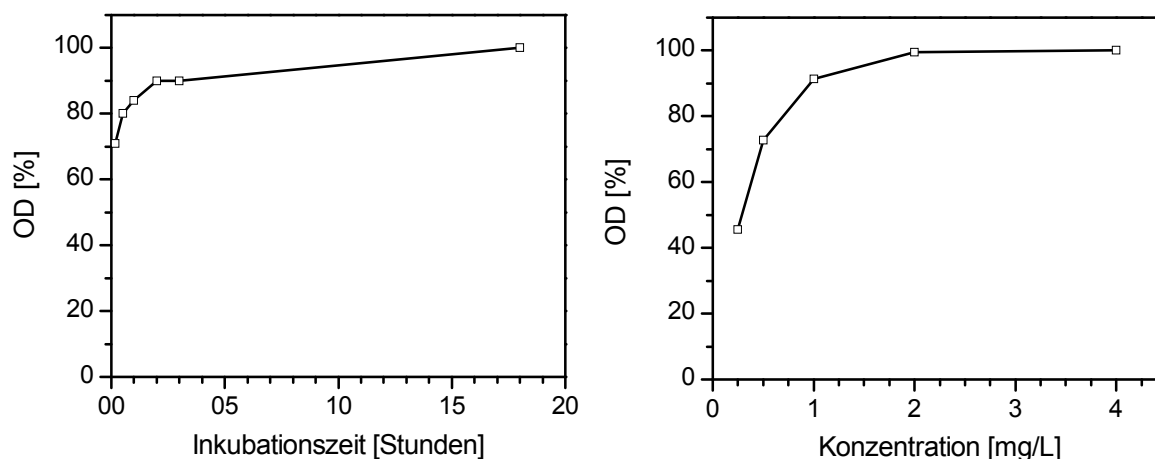


Abbildung 23: Inkubationszeit und Konzentration des sekundären Antikörpers wurden im ELISA variiert (Methode A bei pH 7,6), Skalierung der OD in Prozent des Maximalwertes.

#### Primärer Antikörper

Ähnlich wie beim sekundären Antikörper verlief die Bindung des primären an den sekundären Antikörper sehr schnell. Bereits nach 15 Minuten Inkubationszeit war ein deutliches Signal erzielbar, die Erhöhung der Inkubationszeit auf eine Stunde führte zu einer Signalsteigerung um 40 %. Eine weitere Erhöhung auf drei Stunden brachte eine weitere Signalverstärkung um 10 %. Als Kompromiss zwischen schneller Durchführbarkeit und hoher Signalstärke wurde eine Zeitspanne von einer Stunde gewählt.

Im Gegensatz zum sekundären Antikörper war die Effizienz der Beschichtung mit primärem Antikörper stark pH-abhängig und gelang am besten bei pH 7,6.

### 4.3.3 Vergleich verschiedener CBZ-spezifischer Antikörper

Zwei verschiedene monoklonale CBZ-spezifische Antikörper wurden getestet. Über die erfolgreiche Bindung zwischen dem synthetisierten Tracer und dem von der Firma Biodesign erworbenen Antikörper ist bereits in den vorherigen Kapiteln berichtet worden. Ein weiterer Antikörper der Firma American Research Products (ARP) wurde hingegen verworfen, da er nur bei sehr hohen Konzentrationen von Tracer und Antikörper ein akzeptables Signal zeigte (Tabelle 18). Der hierbei erzielte Testmittelpunkt war mit 2,47 µg/L relativ hoch. Diese unbefriedigenden Ergebnisse sind entweder auf einen allgemein schlechter bindenden Antikörper oder auf eine inkompatible Kombination von Tracer und Antikörper zurückzuführen. Auch von ARP waren keine Informationen über die Struktur des Immunogens zu erhalten.

Tabelle 18: Zwei verschiedene CBZ-spezifische Antikörper wurden im ELISA verglichen (eine Platte; Methode A bei pH 7,6; Tracer: CBZ-Gly<sub>3</sub>-HRP 4)

Antikörperhersteller	Biodesign	ARP
Konzentration Tracer [pmol/L]	24	1900
Konzentration Antikörper [pmol/L]	57	13000
A-Wert	0,70	0,46
C-Wert [µg/L]	0,16	2,47
Immunogen	CBZ-BSA	CBZ-KLH

#### 4.3.4 Optimierung der Konzentrationen von Tracer und Antikörper

Die Signalstärke und der Testmittelpunkt des ELISAs hängen besonders stark von den verwendeten Konzentrationen des Antikörpers und des Tracers ab. Um den in Frage kommenden Konzentrationsbereich beider Reagenzien abzuschätzen, wurden diese Konzentrationen in einem Checkerboard-Verfahren variiert (s. Abbildung 24a). Der Testaufbau lieferte dabei über einen weiten Konzentrationsbereich ein sehr starkes bis akzeptables Messsignal.

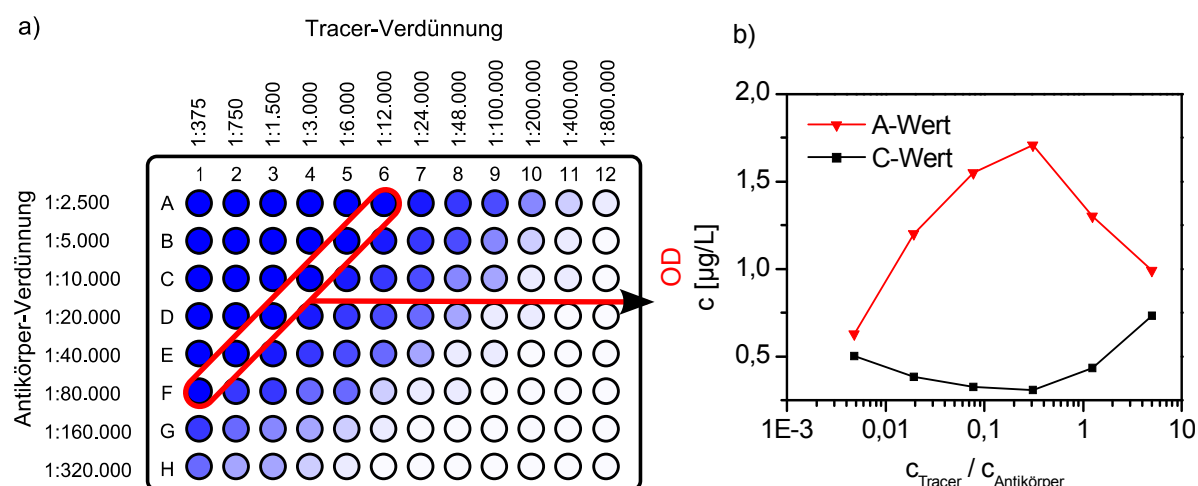


Abbildung 24: a) Checkerboard-Verfahren: Im ELISA wurden Antikörper und Tracer sequentiell entlang der beiden Plattendimensionen verdünnt. Die Intensität der blauen Farbe entspricht der gemessenen Signalthöhe. b) In einem weiteren Experiment wurden zu den markierten Kombinationen Testmittelpunkt (C-Wert) und das Signal des Blindwertes (A-Wert) bestimmt und gegen das Verhältnis der molaren Konzentrationen von Tracer und Antikörper aufgetragen (ELISA bei pH 7,6; Inkubationszeit des Substrats: 30 Sekunden; Konzentrationsangaben beziehen sich auf das gesamte Reaktionsvolumen; die Konzentration des Antikörpers bezieht sich auf die Konzentration in Lösung während der Beschichtung).

Im nächsten Schritt wurden Informationen über den Testmittelpunkt des ELISAs gewonnen, der wie das Messsignal sehr stark von der Konzentration dieser Reagenzien abhängt. Hierzu wurde mit verschiedenen Kombinationen aus Tracer- und Antikörperkonzentration ein ELISA durchgeführt. Das Produkt aus Tracer und Antikörperkonzentration wurde dabei konstant gehalten. Die rot markierten Kavitäten in Abbildung 24a veranschaulichen dieses Vorgehen. Die Wahl eines konstanten Konzentrationsprodukts hat den Vorteil, dass alle Varianten ein ähnlich hohes Messsignal liefern und sich somit auf einer Platte gut auswerten lassen.

Abbildung 24b zeigt, dass das Maximum der Signalstärke und das Minimum des Testmittelpunkts etwa bei demselben Konzentrationsverhältnis von 0,3 lagen. Das Maximum der Signalstärke wäre im idealen Fall bei einem Wert von Zwei zu erwarten. Theoretisch können dann beide Bindungsstellen jedes Antikörpers vollständig mit Tracermolekülen besetzt werden. Da es sich bei der Ligandenbindung um eine Reaktion an der Phasengrenze handelt, ist die Interpretation des ermittelten Zahlenwertes schwierig. Es ist anzunehmen, dass nicht alle eingesetzten Antikörper auf der Platte immobilisiert wurden. Auch dürften durch eine ungünstige Orientierung des Antikörpers oder aus sterischen Gründen nicht alle Bindungsstellen zugänglich sein. Dies kann erklären, weshalb das ermittelte optimale Konzentrationsverhältnis von 0,3 geringer war als erwartet.

Bei diesem Verhältnis von Tracer und Antikörper befand sich nicht nur das Maximum des Testsignals, sondern auch das Minimum des Testmittelpunktes. Diese Beobachtung ist mit dem kompetitiven Charakter der Bindungsreaktion erklärbar. Wenn der Antikörper gegenüber dem Tracer im Überschuss vorliegt, findet erst bei hohen Analytkonzentrationen eine Konkurrenz um die freien Bindungsstellen statt. Liegt ein Überschuss an Tracer vor, ist für eine wirksame Verdrängung des Tracers ebenfalls eine höhere Analytkonzentration nötig als im äquimolaren Zustand. Beide Fälle führen zu einem Ansteigen des Testmittelpunkts.

Ein wesentliches Ziel bei der Optimierung eines kompetitiven ELISAs ist es daher, ein ideales Verhältnis zwischen der Zahl der Tracermoleküle und der Zahl der effektiv nutzbaren Bindungsstellen des Antikörpers herzustellen. Ein anderes Ziel besteht darin, die Konzentrationen beider Reagenzien soweit wie möglich zu verringern, da hierdurch die Empfindlichkeit der Methode ansteigt.

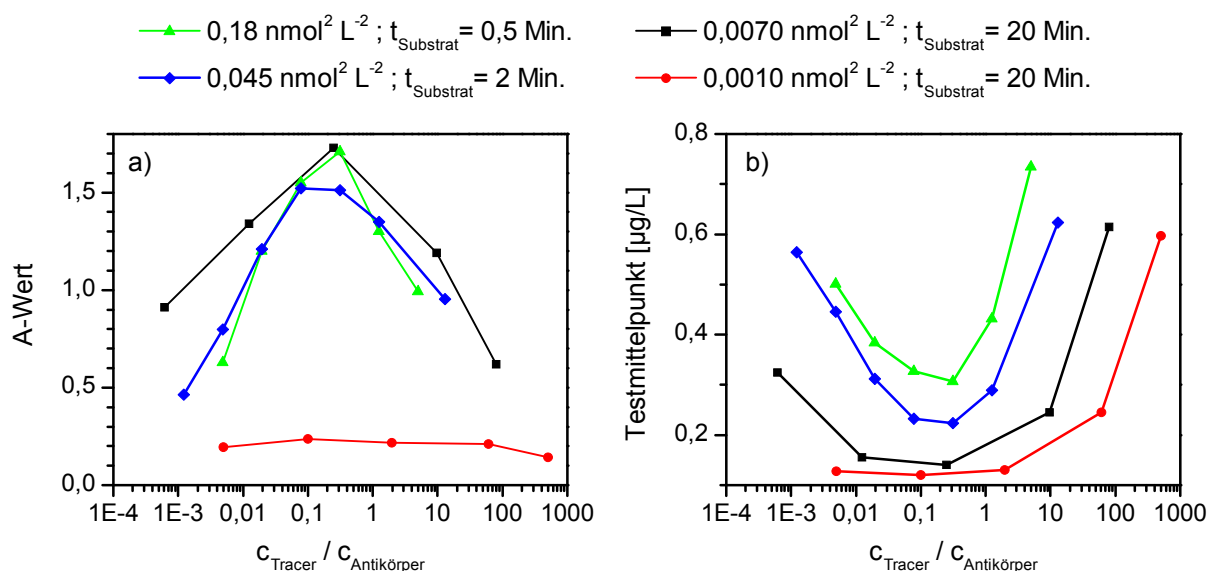


Abbildung 25: Wie in Abbildung 24 wurden im ELISA die Konzentrationen von Antikörper und Tracer variiert, wobei für jeden Datensatz das Produkt aus beiden Konzentrationen (in nmol<sup>2</sup> L<sup>-2</sup>) konstant gehalten wurde.

Mit den anfänglich gewählten Konzentrationen von Tracer und Antikörper wurde ein mehr als ausreichend hohes Signal erreicht. Daher wurden sukzessive die Konzentrationen beider Reagenzien verringert. Wie anfänglich dargestellt, wurden die Konzentrationen von Tracer und Antikörper variiert, wobei das Produkt beider Konzentrationen auf jeder Platte jeweils

konstant gehalten wurde. Das Absinken des Signals wurde durch eine Verlängerung der Substratentwicklungszeit von ursprünglich 0,5 Minuten auf bis zu 20 Minuten kompensiert. Bei dieser Reaktionsdauer wurde bei einem Konzentrationsprodukt von  $0,001 \text{ nmol}^2/\text{L}^2$  eine noch auswertbare OD von 0,24 erreicht (s. Abbildung 25a).

Mit sinkendem Konzentrationsprodukt sank auch der Testmittelpunkt bis auf einen Wert von ca.  $0,12 \mu\text{g/L}$  (s. Abbildung 25b). Der Testmittelpunkt beschrieb in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis aus Tracer und Antikörper bei allen Konzentrationsprodukten einen parabelförmigen Kurvenverlauf. Der Fußpunkt dieser Parabeln lag bei allen untersuchten Konzentrationsprodukten bei Konzentrationsverhältnissen zwischen 0,1 und 0,3 und damit im selben Bereich wie die Absorptionsmaxima. Die Parabeln wurden mit sinkendem Produkt immer breiter, so dass bei einem Konzentrationsprodukt von  $0,001 \text{ nmol}^2/\text{L}^2$  für Konzentrationsquotienten zwischen 0,004 und 20 ein annähernd konstanter Testmittelpunkt erhalten wurde.

Die Empfindlichkeit eines kompetitiven Immunoassays ist prinzipbedingt durch die Affinität des Antikörpers begrenzt [301]. Im vorliegenden Fall wurde dieses Affinitätslimit nicht ganz erreicht. Eine weitere Verringerung der Reagenzienkonzentrationen hätte vermutlich zu einer geringfügigen Verringerung des Testmittelpunktes geführt - zu Lasten der Signalstärke. Zwischen der schwarzen und der roten Kurve in Abbildung 25 wurde die Verringerung des Testmittelpunktes um 10 % mit einem Signalverlust um den Faktor 8 erkauft.

An dieser Stelle verkomplizierte sich der Optimierungsprozess, da sich der verringerte Testmittelpunkt bei einem sich verschlechternden Signal-Rausch-Verhältnis nicht zwangsläufig in einem Sensitivitätsgewinn niederschlägt. Da die erreichte Nachweisgrenze für den Einsatz in der Gewässeranalytik ausreichte (s. Kapitel 4.5.1), wurde die Optimierung an dieser Stelle beendet. Das Erreichen noch niedrigerer Nachweisgrenzen ist zum Beispiel durch den Einsatz empfindlicher nachweisbarer Fluoreszenzsubstrate oder Enzymlabels mit höherer Nachweiskraft (z. B. Penicillinase [302]) denkbar.

Diese Ergebnisse wurden genutzt, um für den Routineeinsatz des ELISAs geeignete Konzentrationen für Antikörper und Tracer zu wählen. Bei den abschließend gewählten Bedingungen (s. Tabelle 16) betrug das Konzentrationsverhältnis von Tracer und Antikörper 2,1. Dieser Wert lag etwas höher als das ermittelte Optimum, führte aber nicht zu nennenswerten Sensitivitätseinbußen. Diese Maßnahme verringerte den Verbrauch des Antikörpers sowie die Anzahl der insgesamt nötigen Verdünnungsschritte.

Ausgehend vom etablierten Checkerboard-Experiment ließen sich mit der dargestellten Optimierungsstrategie die Konzentrationen von Antikörper und Tracer in wenigen Schritten optimieren. Dieses Verfahren scheint auch für andere kompetitive ELISAs geeignet zu sein. In einem einzelnen Experiment mit einem voroptimierten Koffein-ELISA deutete sich ein ähnlicher Kurvenverlauf an. Abbildung 26 zeigt, dass Testsignal und Testmittelpunkt bei einem Konzentrationsverhältnis  $c_{\text{Tracer}}/c_{\text{Antikörper}}$  zwischen 0,01 und 0,1 optimal sind. Ein ähnliches Verhältnis von 0,33 wurde – bei deutlich höherem experimentellem Aufwand - durch sukzessives Verdünnen beider Komponenten ermittelt [298, 303].

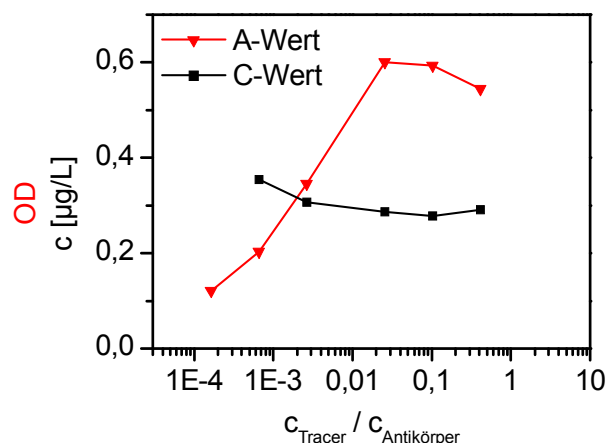


Abbildung 26: Ausgehend vom voroptimierten Koffein-ELISA wurden Experimente mit variierendem Verhältnis von Tracer und Antikörper durchgeführt. Der Graph zeigt die Abhängigkeit der Signalthöhe (A-Wert) und des Testmittelpunkts (C-Wert) vom Quotienten aus molarer Tracer- und Antikörperkonzentration. Das Produkt aus den Konzentrationen von Tracer und Antikörper betrug  $0,014 \text{ nmol}^2/\text{L}^2$ .

#### 4.3.5 Inkubationszeit der Ligandenbindungsreaktion

Bei einer kinetisch kontrollierten Reaktion kann sich eine Vorinkubation des Analyten vor der Tracerzugabe positiv auf den Testmittelpunkt auswirken. Nach dem Grundsatz „First come, first served“ [304] erhält dabei der Analyt gegenüber dem Tracer quasi einen Vorsprung in der Konkurrenz um die Bindungsplätze.

Für den CBZ-ELISA wurde untersucht, ob die Reihenfolge der Auftragung von Tracer und Proben eine Rolle spielte. Der Testmittelpunkt blieb nahezu unverändert, egal ob der Tracer vor oder nach der Probe aufgetragen wurde (s. Abbildung 27). Mit steigender Vorinkubationszeit der Probe sank die Signalstärke. Dies lässt sich damit erklären, dass bei der konstant gehaltenen Gesamtinkubationszeit die Tracerinkubationszeit verkürzt wurde, so dass insgesamt weniger Tracer an die Platte gebunden wurde. Da die beobachteten Unterschiede in der Signalstärke relativ gering waren, lässt sich folgern, dass die Bindungsreaktion bei den gewählten Zeiten überwiegend abgeschlossen war.

Eine Vorinkubation des Tracers führte zu einem höheren A-Wert sowie zu einem höheren D-Wert. Das höhere Hintergrundsignal bei steigender Vorinkubationszeit deutete darauf hin, dass die Bindung des Tracers an den Antikörper im Versuchszeitraum nicht reversibel war. Der höhere A-Wert war darauf zurückzuführen, dass im Vergleich zur gleichzeitigen Zugabe von Probe und Tracer die Tracerkonzentration doppelt so hoch war und daher mehr Tracer pro Zeit an die Platte binden konnte.

Eine Vorinkubation des Analyten vor Tracerzugabe führte zu keiner signifikanten Sensitivitätsverbesserung, so dass im Folgenden beide Komponenten gleichzeitig zugegeben wurden. Die gemeinsame Inkubationszeit wurde auf 30 Minuten festgesetzt.

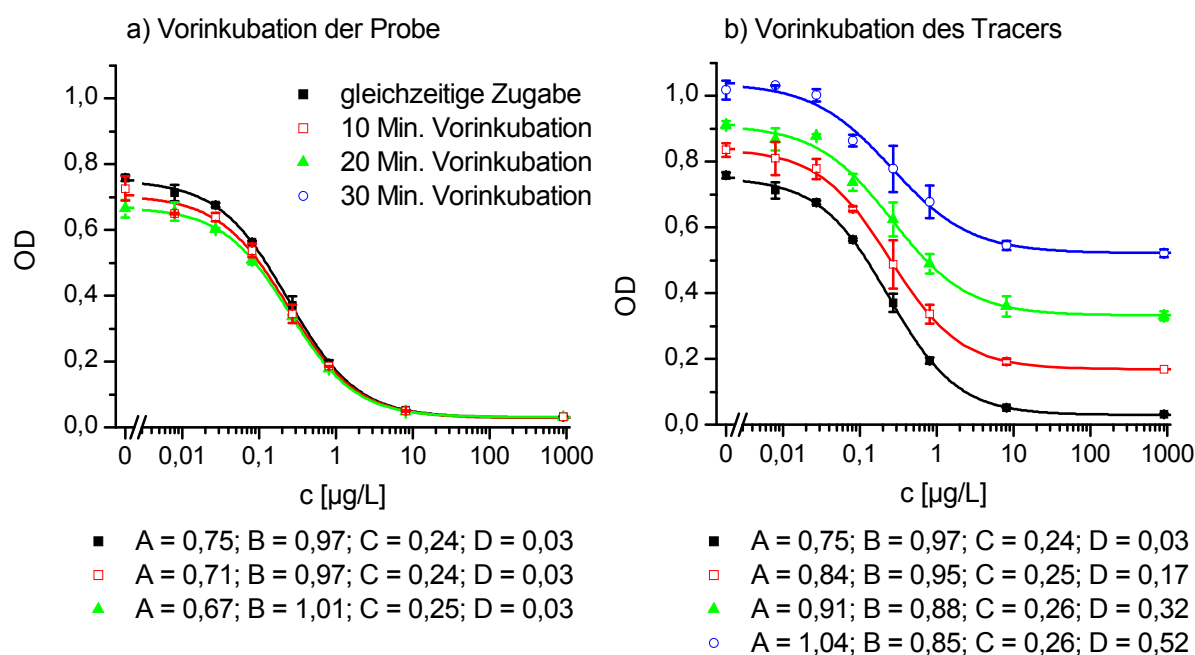


Abbildung 27: Kalibrierkurven des CBZ-ELISAs bei verschiedenen zeitlichen Abständen der Tracer- und Probenauflage: 100 µL Tracer- und 100 µL Kalibrierlösung wurden im zeitlichen Abstand von 0-30 Minuten auf die Platte aufgetragen, die Gesamtinkubationszeit betrug in allen Fällen 60 Minuten (ELISA Methode A bei pH 7,6).

Kürzere gemeinsame Inkubationszeiten sind prinzipiell möglich, führen aber zu einem schwächeren Signal und zu größeren Inhomogenitäten innerhalb der Platte (zur Plattendrift siehe Kapitel 4.5.1). Die Testmittelpunkte waren bei gemeinsamen Inkubationszeiten von 5, 15 und 30 Minuten nicht signifikant verschieden. Längere gemeinsame Inkubationszeiten wurden getestet, führten aber zu einer etwas geringeren Sensitivität. So erbrachte eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 3 Stunden gegenüber 30 Minuten zwar ca. 30 % mehr Signal, aber auch einen 20 % höheren Testmittelpunkt.

Es bleibt festzuhalten, dass die gemeinsame Inkubationszeit von Tracer und Probe im getesteten Rahmen einen vergleichsweise kleinen Einfluss auf Signal und Sensitivität hatte und somit bei Bedarf verändert werden kann.

#### 4.3.6 Probenpuffer

Die Zusammensetzung des Probenpuffers bestimmt die Umgebung, in der die Bindungsreaktion stattfindet. Die Art und Konzentration der beteiligten Salze, der pH-Wert sowie Beimischungen können diese Bindungsreaktion entscheidend beeinflussen.

Der NaCl-Gehalt hatte einen entscheidenden Einfluss auf das Endsignal. Das Signal stieg bis zu einer Konzentration von 0,2 M NaCl stark an und ging danach in einen flacheren Verlauf über (s. Abbildung 28). In Abwesenheit von Kochsalz brach das Messsignal drastisch ein und war gerade noch auswertbar. Möglicherweise ist dieser Signalgewinn durch eine Aktivitätssteigerung der Peroxidase bei zunehmendem Salzgehalt bedingt. Der Testmittelpunkt blieb dabei unverändert, was ein Indiz dafür ist, dass die Ionenstärke keinen wesentlichen Einfluss auf das Bindungsgleichgewicht hatte.

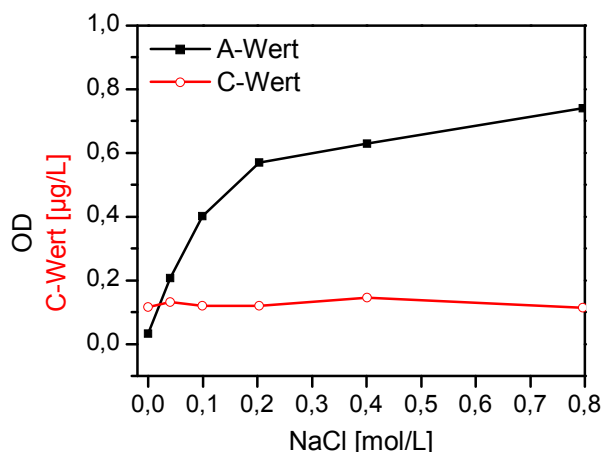


Abbildung 28: Einfluss des Kochsalzgehalts während der Ligandenbindungsreaktion auf das Signal und den Testmittelpunkt des ELISAs. Reaktion wurde in 0,003 M Glycinpuffer bei pH 9,5 durchgeführt.

Um die Signalstärke zu maximieren, wurde daher der ELISA bei einer Salzkonzentration von 0,75 M durchgeführt, was einem Salzgehalt im Probenpuffer von 3M entsprach. Dies hat den vorteilhaften Nebeneffekt, dass Realproben mit hohem Salzgehalt (z. B. Meerwasser) mit geringerer Abweichung analysiert werden können.

Der pH-Wert des Probenpuffers spielte ebenfalls eine wichtige Rolle (s. Kapitel 4.4.3).

#### 4.3.7 Robustheit der Methode

Organische Lösungsmittel in der Probe hatten einen deutlichen Einfluss auf den Test. Die Kalibrierkurven veränderten sich in dreierlei Hinsicht. Die Signalstärke (A-Wert) nahm mit steigendem Lösungsmittelanteil ab, gleichzeitig stieg der Testmittelpunkt (C-Wert) an (s. Abbildung 29). Außerdem nahm das Hintergrundsignal (D-Wert) ab. Acetonitril hatte dabei einen deutlich stärkeren Einfluss auf den Test als Methanol.

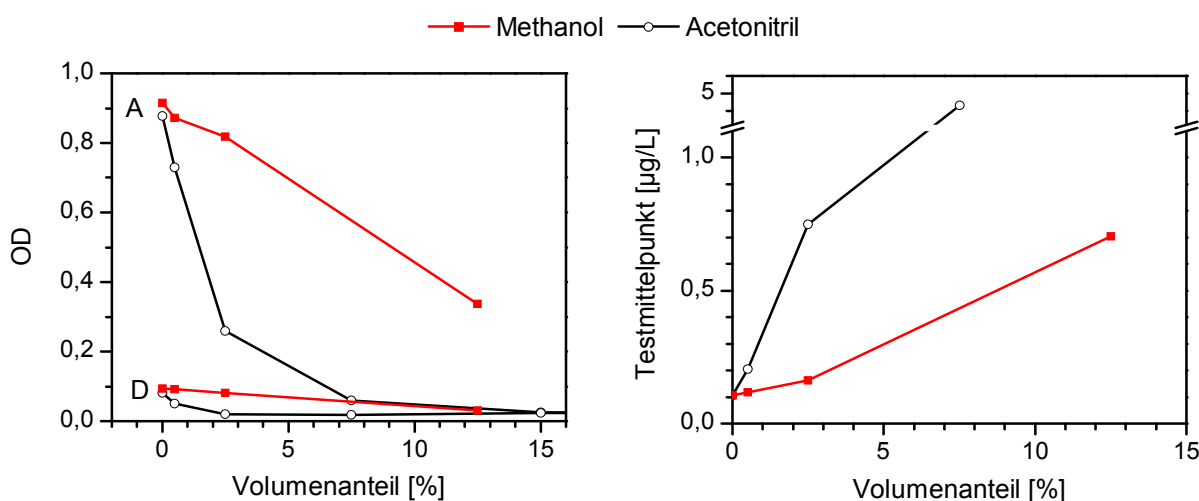


Abbildung 29: Einfluss des Volumenanteils von Methanol und Acetonitril in einer Probe auf die obere (A) und untere (D) Asymptote sowie den Wendepunkt der Kalibrierkurve des CBZ-ELISAs; ELISA wurde bei pH 7,6 durchgeführt (ELISA Methode A).

Die Abnahme der Signalintensität ist hauptsächlich auf die Denaturierung der eingesetzten Proteine zurückzuführen. Die Änderung des Testmittelpunktes ist vermutlich auf eine Interaktion des organischen Lösungsmittels mit den Liganden und der daraus resultierenden geringeren Affinitätskonstanten des Antikörpers zurückzuführen.

Bei der Quantifizierung von CBZ in Gewässern hat das Vorhandensein von organischen Lösungsmitteln Einfluss auf die Genauigkeit. Die Erhöhung des Testmittelpunktes führt zu einer Unterbestimmung, die Abnahme von Signalstärke und Hintergrundsignal zu einer Überbestimmung der Analytkonzentration. Abhängig von der Analytkonzentration können sich diese Einflüsse gegenseitig aufheben (s. Abbildung 30). Bei einer Konzentration von 2,5 % Methanol oder 0,5 % Acetonitril beträgt die Abweichung im Bereich zwischen 0,05 und 2 µg/L weniger als 25 % und ist für die meisten Anwendungszwecke akzeptabel. In Trinkwasser und kommunalen Abwässern besteht kaum Gefahr, dass diese Werte überschritten werden.

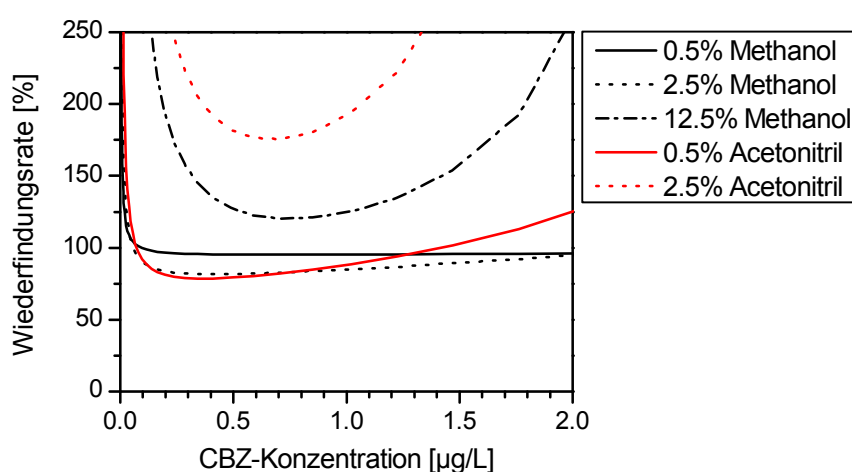


Abbildung 30: Simulierte Wiederfindungsrate von lösungsmittelhaltigen Standardlösungen bezogen auf lösungsmittelfreie Kalibrierlösungen, in Abhängigkeit von der Analytkonzentration.

Besteht Verdacht, dass in einer Probe aufgrund von vorhandenen Lösungsmitteln eine zu hohe Konzentration gemessen wird, kann durch Verdünnung der Probe die Richtigkeit des Messergebnisses verbessert werden. Um die Denaturierung der Proteine zu verhindern bietet es sich darüber hinaus an, die Kontaktzeit durch eine verkürzte Inkubationszeit zu vermindern. Gegebenenfalls ist hierbei eine Erhöhung der Tracerkonzentration nötig, um die Signalstärke aufrechtzuerhalten.

Darüber hinaus wurde der Einfluss einiger weiterer potentiell störender Stoffe untersucht: Fe(II)-Ionen, die im Grundwasser vor der Trinkwasseraufbereitung häufig in hohen Konzentrationen vorliegen, haben auf den CBZ-ELISA keinen signifikanten Einfluss [305].

Tests mit synthetischen Huminsäuren zeigten bis zu einer Konzentration von 10 mg/L einen vernachlässigbaren Effekt auf den CBZ-ELISA [306]. Die Zugabe von BSA, das im Ruf steht etwaige Störungen durch Huminsäuren und ähnliche Stoffe verringern zu können [247, 307], führte zu keiner Verschlechterung des Tests, außer einer Erhöhung des Testmittelpunktes um ca. 50 % [306]. Dieser Effekt trat nur bei pH 10,5 und nicht bei pH 7,6 auf. Offenbar liegt bei pH-Wert 10,5 ein Teil des CBZ an BSA gebunden vor. Unter neutralen und basischen Bedingungen ist die Bindung zwischen CBZ und BSA vermutlich zu schwach oder sie



geschieht deutlich langsamer als die Bindung an den Antikörper. BSA wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit (ELISA-Methode A) als Pufferzusatz verwendet. Später wurde jedoch darauf verzichtet (ELISA-Methode B), da BSA wegen seiner Neigung zur Schaumbildung schwierig zu pipettieren war und dabei kaum Vorteile bot.

Der Einfluss von Detergentien auf den ELISA war gering. Der Zusatz von Polysorbat 20 (Tween20) führte bis einschließlich der getesteten Höchstkonzentration von 0,5 % zu keinerlei messbaren Veränderungen des Tests. Auch eine Verbesserung der Sensitivität, wie für einen anderen ELISA nach Zugabe von 0,1 % Tween berichtet wurde [308], konnte nicht festgestellt werden.

#### 4.3.8 Plattenkonservierung

Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Antikörpern macht einen erheblichen Teil des Aufwands und der Arbeitszeit aus. Dieser Arbeitsschritt wird in der Regel direkt vor der Testdurchführung vorgenommen, kann jedoch durch eine Konservierung der Platte ausgelagert werden, wodurch ein flexiblerer Einsatz des ELISAs möglich wird.

Daher wurde eine von Kolosova et al. vorgeschlagene Konservierungsmethode für den CBZ-ELISA getestet [309]. Um Kosten zu sparen, wurde dabei das ursprüngliche Rezept für die Konservierungslösung verdünnt, wodurch sich keine messbare Verschlechterung der Konservierung ergab. Die Kosten der Konservierung konnten dadurch von 5 Euro auf 40 Cent pro Platte verringert werden.

Die konservierten Platten wurden über einen Zeitraum von 12 Wochen bei 4°C gelagert und im Abstand von zwei Wochen mit einer frisch beschichteten Platte verglichen. Das Signal der konservierten Platten blieb dabei relativ konstant in einem OD-Bereich von 0,6-0,8 (s. Abbildung 31a). Die an verschiedenen Tagen frisch beschichteten Platten lieferten deutlich stärkere Signalschwankungen als die konservierten Platten, die alle am gleichen Tag beschichtet wurden. Dies ist ein Indiz dafür, dass schon kleinere Abweichungen beim Beschichtungsprozess (z. B. Konzentration, Temperatur, Ozonkonzentration in der Luft, etc.) einen erheblichen Einfluss auf das Endsignal im ELISA haben können.

Ebenso wichtig wie die Signalstärke ist die Homogenität der Platten, die durch die gleiche Behandlung aller 96 Kavitäten überprüft wurde. Der Variationskoeffizient der konservierten Platten lag dabei mit durchschnittlich 3,5 % nur geringfügig höher als derjenige der frisch beschichteten Platten (3,2 %).

In einem weiteren Experiment wurde die Langzeitstabilität durch eine 5-wöchige Lagerung bei 40°C im Trockenschrank simuliert. Dabei wurden immer noch 73 % des Signals einer frisch beschichteten Platte erreicht. Der Variationskoeffizient der 96 Kavitäten betrug 3,2 % und war damit nur unwesentlich höher als bei der Referenzplatte. Unter der Annahme, dass bei 40°C im Trockenschrank dieselben Zersetzungsreaktionen ablaufen wie bei 4°C im Kühlschrank, lässt sich mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung die Lagerungsfähigkeit im Kühlschrank extrapolieren. Eine 5-wöchige Lagerung bei 40°C entspricht hiernach ungefähr einer 60-wöchigen Lagerung bei 4°C. Somit erscheint die Lagerung der Platten für ein Jahr oder länger möglich.

Zu erwähnen ist, dass bei einer ungeschützten Lagerung im Kühlschrank schon nach wenigen Wochen einige Kavitäten sehr starke Signaleinbußen zeigten. Offenbar war Feuchtigkeitsbildung hierfür der Grund, da dieses Problem bei der Lagerung in einem geschlossenen Gefäß mit einer kleinen Menge Trockenmittel nicht auftrat.

Bei der Quantifizierung von Gewässerproben wurde hinsichtlich der bestimmten Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zwischen einer frisch beschichteten und einer konservierten Platte gefunden.

Konservierte Platten wurden in dieser Arbeit gelegentlich verwendet und insbesondere dann, wenn nur wenige Proben zu messen waren.

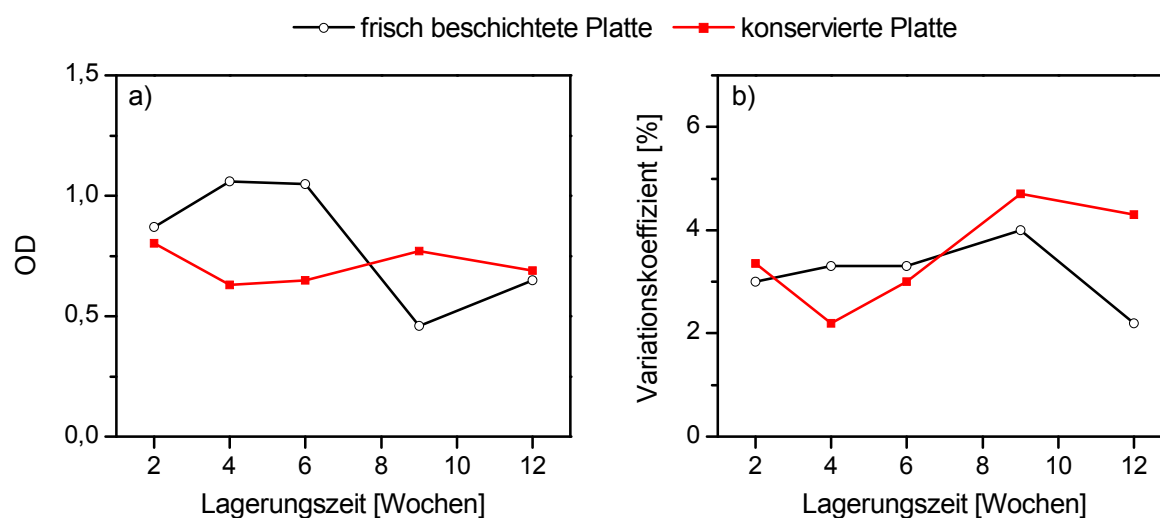


Abbildung 31: ELISA-Platten wurden nach Beschichtung mit sekundärem und primärem Antikörper konserviert und bei 4°C 2-12 Wochen gelagert. Danach wurde die Signalstärke (a) und die Homogenität innerhalb der 96 Kavitäten bestimmt (b) und mit einer frisch beschichteten Platte verglichen.

## 4.4 Selektivität des CBZ-spezifischen Antikörpers

Der erhebliche Geschwindigkeits- und Kostenvorteil der Immunoassays wird in der Praxis durch ihre Tendenz zu falsch-positiven Analyseergebnissen relativiert [310]. Zur Validierung des Immunoassays wurde deshalb eine Untersuchung möglicher Kreuzreaktanden durchgeführt.

Als mögliche Kreuzreaktanden bei der Untersuchung von Gewässerproben kommen in erster Linie Arzneimittel und ihre Abbauprodukte in Frage. Zunächst wurde daher eine Literaturrecherche durchgeführt und anschließend diejenigen Substanzen überprüft, die sowohl eine Ähnlichkeit in der Molekülstruktur als auch eine nennenswerte Verbreitung in der Umwelt besitzen. Nachdem dieser konventionelle Ansatz offenbar nicht alle relevanten Kreuzreaktanden hervorbrachte und bei der Quantifizierung von CBZ in Gewässern weiterhin beträchtliche Überbestimmungen auftraten, wurde mit der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und ELISA ein wirkungsbezogener analytischer Ansatz verfolgt (s. Kapitel 4.4.2).

#### 4.4.1 Kreuzreaktionen

Alle Metaboliten von CBZ zeigten Kreuzreaktivitäten von weniger als 100 % (Tabelle 19). EP-CBZ zeigte die mit Abstand höchste Kreuzreaktivität von ca. 70 %. Daneben ist noch 2-OH-CBZ mit einer Kreuzreaktivität von ca. 15 % erwähnenswert, die im basischen Milieu auf unter 1 % abfällt. Die Kreuzreaktivitäten der übrigen Metaboliten lagen unter 3 %.

Die untersuchten Arzneimittel lassen sich in trizyklische Verbindungen und Verbindungen mit Diphenylmethyl-Gruppe (s. Kapitel 4.4.2) unterteilen. Die trizyklischen Verbindungen Amitriptylin, Imipramin, Opipramol, Protriptylin, Doxepin und Loratadin zeigten abhängig vom pH-Wert relativ geringe Kreuzreaktivitäten zwischen 0,2 % und 11 %. Zur zweiten Gruppe gehörten neben Cetirizin die Arzneimittel Hydroxyzin, Norchlorcyclizin, Cloperastin und Diphenhydramin, die zum Teil sehr hohe Kreuzreaktivitäten von mehr als 400 % zeigten.

Dass Cetirizin in der Lage ist, an einen CBZ-spezifischen Antikörper zu binden, ist bereits zuvor bei einem in der klinischen Diagnostik verwendeten Analysegerät beschrieben worden [311]. Parant et al. bestimmten die spezifische (massenbezogene) Kreuzreaktivität von Cetirizin, Hydroxyzin, Norchlorcyclizin, Norcyclizin, Homochlorcyclizin und Oxatomid als 125 %, 85 %, 66 %, 50 %, 25 % und 15 %. Für Flunarizin, Cinnarizin, Terfenadin und Meclizin wurden geringe Kreuzreaktivitäten von weniger als 5 % bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden bei pH 7,6 ähnliche spezifische Kreuzreaktivitäten gegen Cetirizin, Hydroxyzin und Norchlorcyclizin gefunden. Da ebenfalls ähnlich hohe Kreuzreaktivitäten gegenüber EP-CBZ bestimmt wurden [312], liegt die Vermutung nahe, dass in beiden Immunoassays sehr ähnliche, wenn nicht sogar dieselben Antikörper zum Einsatz kamen.

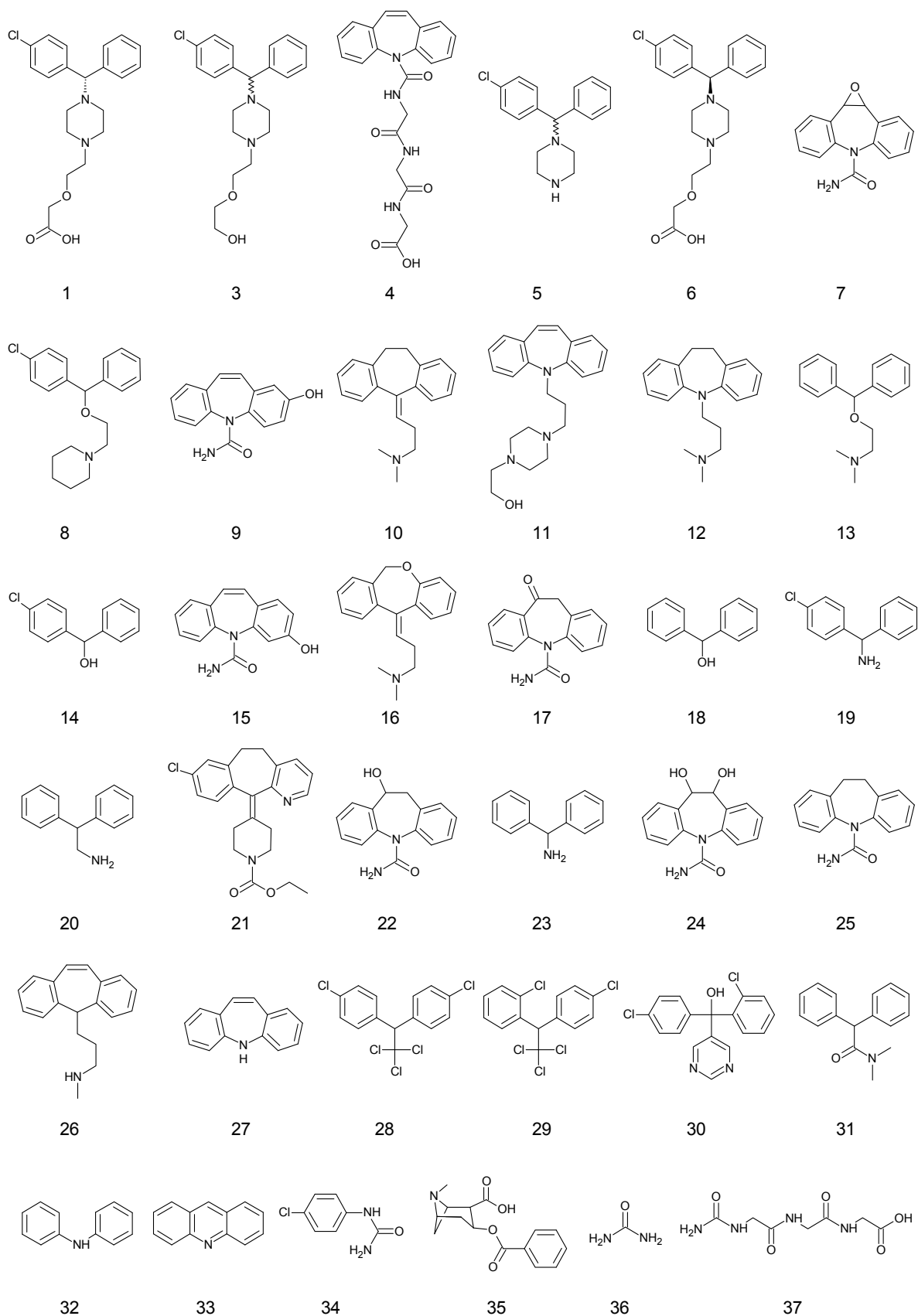


Abbildung 32: Strukturen von Stoffen, die auf ihre Kreuzreaktivität im CBZ-ELISA untersucht wurden. Zur Nummerierung siehe Tabelle 19.

Tabelle 19: Molare Kreuzreaktivitäten bei vier verschiedenen pH-Werten. Mittelwerte und absolute Standardabweichungen, Anzahl der Messungen in Klammern angegeben. Lewis-Formeln zu allen Verbindungen: siehe Abbildung 32;  $pK_a$ -Werte ohne Referenz wurden per Software berechnet (ACD Labs).

Nr.	Substanz (CAS-Nr.)	pH 4,5	pH 7,6 mit BSA	pH 9,5	pH 10,5	$pK_a$
1	(S)-Cetirizin (130018-76-7)	616 ± 103 % (4)		81 ± 6 % (4)	43 ± 5 % (6)	
2	Rac-Cetirizin (83881-51-0)	403 ± 69 % (16)	193 ± 5 % (3)	50 ± 5 % (11)	22 ± 2 % (17)	2,2; 2,9; 8,0 [313]
3	Hydroxyzin (68-88-2)	273 ± 61 % (3)	100 ± 18 % (4)	41 ± 0 % (1)	24 ± 1 % (3)	2,0; 7,4 [314]
4	CBZ-Triglycin (81879-94-9)	224 ± 30 % (3)	208 ± 12 % (4)	160 ± 18 % (3)	207 ± 4 % (2)	
5	Norchlorcyclizin (303-26-4)	206 ± 5 % (3)	196 ± 53 % (6)	114 ± 7 % (3)	45 ± 4 % (3)	9,0
6	(R)-Cetirizin (130018-77-8)	144 ± 9 % (4)		3,4 ± 0,1 % (4)	1,3 ± 0,2 % (6)	
7	Levocetirizin (R-Cetirizin, Xusal-Tropfen)	129 ± 15 % (6)	47 ± 8 % (7)	3,8 ± 0,5 % (6)	1,2 ± 0,2 % (6)	
8	EP-CBZ (36507-30-9)*	67 ± 6 % (5)	73 ± 9 % (6)	63 ± 3 % (5)	68 ± 4 % (4)	-0,5; 13,9
9	Cloperastin (3703-76-2)	35 ± 4 % (3)	10 ± 3 % (5)	13 ± 2 % (3)	7,2 ± 2,3 % (3)	8,7
10	2-OH-CBZ (68011-66-5)	14 ± 1 % (4)	14 ± 1 % (5)	3,4 ± 0,2 % (4)	0,81 ± 0,15 % (3)	10,3
11	Amitriptylin (549-18-8)	11 ± 2 % (3)	5,9 ± 1,2 % (3)	4,9 ± 0,7 % (3)	1,8 ± 0,4 % (3)	9,4 [315]
12	Opipramol (909-39-7)	10 ± 4 % (3)	7,8 ± 5,3 % (3)	2,3 ± 1,2 % (3)	1,2 ± 0,4 % (3)	4,1; 7,9 [316]
13	Imipramin (113-52-0)	5,9 % (1)	5,6 ± 2,5 % (3)	3,1 ± 0,2 % (2)	1,4 ± 0 % (2)	9,5 [315]
14	Diphenhydramin (147-24-0)	5,8 ± 0,2 % (2)	3,3 ± 0,1 % (3)	2,7 ± 0,5 % (2)	1,3 ± 0 % (2)	9,3 [317]
15	4-Chlorobenzhydrol (119-56-2)	3,9 ± 0,7 % (3)	1,7 ± 0,2 % (4)	2,7 ± 0,3 % (3)	3 ± 0,2 % (3)	13,3
16	3-OH-CBZ (68011-67-6)	2,2 ± 0,7 % (4)	1,7 ± 0,1 % (4)	0,35 ± 0,02 % (4)	0,14 ± 0,01 % (3)	10,0
17	Doxepin (1668-19-5)	1,6 ± 0,7 % (3)	0,82 ± 0,12 % (4)	0,63 ± 0,19 % (2)	0,26 ± 0,09 % (2)	9,0 [318]
18	Ox-CBZ (28721-07-5) *	1,2 ± 0,1 % (3)	0,66 ± 0,04 % (3)	0,56 ± 0,04 % (3)	0,54 ± 0,01 % (2)	10,7 [76]
19	Benzhydrol (91-01-0)	0,65 ± 0,21 % (2)	0,31 ± 0,06 % (3)	0,32 ± 0,12 % (2)	0,23 ± 0,01 % (2)	14,0
20	4-Chlorobenzhydrolamin (28022-43-7)	0,65 ± 0,03 % (2)	1,5 ± 0,2 % (3)	4,1 ± 0,9 % (2)	4,5 ± 0,7 % (2)	8,1
21	(Diphenylmethyl)methylamin (14683-47-7)	0,63 ± 0,13 % (2)	0,74 ± 0,09 % (3)	1,5 ± 0,4 % (2)	1,5 ± 0,3 % (2)	8,8
22	Loratadin (79794-75-5)	0,62 ± 0,12 % (2)	0,79 ± 0,16 % (5)	2,2 ± 0 % (2)	2,1 ± 0,3 % (2)	4,9-6,0 [319]
23	10-OH-CBZ (29331-92-8)	0,56 ± 0,01 % (2)	0,47 ± 0,16 % (3)	0,45 ± 0,08 % (2)	0,5 ± 0,07 % (2)	
24	Benzhydrolamin (91-00-9)	0,17 ± 0,06 % (2)	0,2 ± 0,02 % (3)	0,52 ± 0,06 % (2)	0,48 ± 0,1 % (2)	8,4
25	DiOH-CBZ (58955-93-4)	0,01 % (1)	0,011 ± 0 % (3)	0,007 % (1)	0,009 % (1)	
26	Dihydro-CBZ (3564-73-6)		98 ± 6 % (3)			
27	Protriptylin (438-60-8)		12 ± 2 % (3)			
28	Iminostilben (256-96-2)		0,29 ± 0,2 % (3)			
29	p,p-DDT (789-02-6)		0,041 % (1)			
30	p,p-DDT (50-29-3)		0,041 % (1)			
31	Fenarimol (60168-88-9)		0,027 % (1)			
32	Diphenamid (213-482-4)		0,016 % (1)			
33	Diphenylamin (122-39-4)		0,0035 % (1)			0,85 [320]
34	Acridin (260-94-6)		0,0015 ± 0,0012 % (2)			5,8 [321]
35	4-Chlorophenylharnstoff (140-38-5)		0,001 % (1)			
36	Benzoyllecgonin (519-09-5)		<0,001 % (1)			
37	Harnstoff (57-13-6)		<0,001 % (1)			
38	Triglycin (556-33-2)		<0,001 % (1)			

\*EP-CBZ und Ox-CBZ waren mit 0,8 % bzw. 0,5 % CBZ verunreinigt.

#### 4.4.2 Identifizierung von Kreuzreaktanden mit Hilfe eines LC-ELISAs

Abwasser enthält eine kaum zu überschauende Anzahl gelöster Stoffe und stellt daher sowohl chromatographische als auch immunchemische Analyseverfahren vor Herausforderungen. Das LC-DAD-UV-Chromatogramm einer 4000-fach konzentrierten Abwasserprobe (s. Abbildung 33a) verdeutlicht diese Komplexität und zeigt eine Vielzahl nicht aufgelöster Peaks.

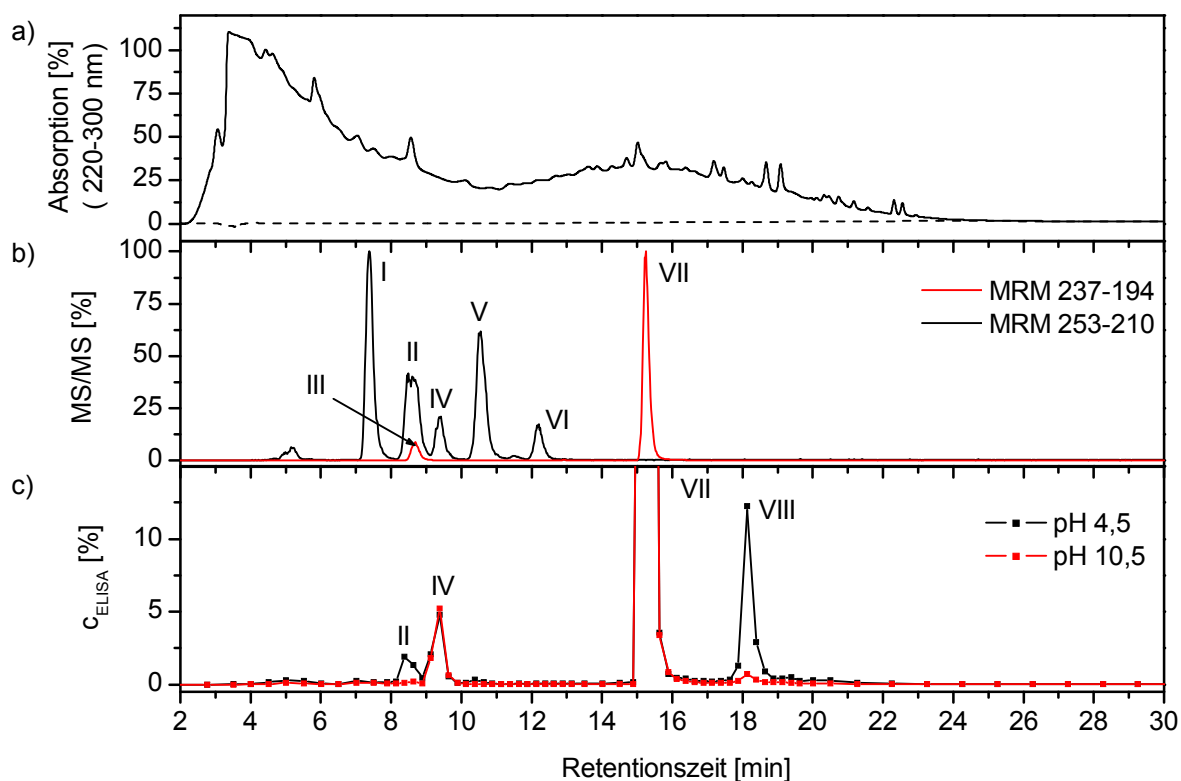


Abbildung 33: Eine 4000-fach konzentrierte Abwasserprobe wurde analysiert mit LC-DAD UV (a), LC-MS/MS im MRM Modus (b), LC-ELISA bei pH 4,5 und pH 10,5 (c). Die Graphen wurden relativ zum höchsten Peak skaliert. Die gestrichelte Linie in Abbildung a) stellt das Chromatogramm von Reinstwasser dar. Die Peaks konnten folgendermaßen zugeordnet werden: DiOH-CBZ (I), 2-OH-CBZ (II), 10-OH-CBZ (III), EP-CBZ (IV), 3-OH-CBZ (V), CBZ (VII) und Cetirizin (VIII). Peak VI konnte nicht zugeordnet werden.

Gleichzeitig enthält Abwasser auch die meisten Substanzen, die bei der Analyse von Gewässern das Ergebnis des ELISAs beeinflussen können. Aus diesem Grund wurde eine Abwasserprobe per HPLC fraktioniert und mit dem ELISA sowie massenspektrometrisch analysiert. Diese Prozedur ist an anderer Stelle im Detail diskutiert worden und soll hier nur verkürzt wiedergegeben werden [285].

Die Abwasserprobe wurde fraktioniert und nach der Entfernung des organischen Lösungsmittels mit dem ELISA analysiert. Dabei traten vier größere Peaks auf, die als 2-OH-CBZ, EP-CBZ, CBZ und Cetirizin identifiziert werden konnten (s. Abbildung 33c). Erstere konnten über die Retentionszeit bestimmt werden, Cetirizin wurde über das Massenspektrum identifiziert. Da dieses Spektrum eine Vielzahl an Peaks aufwies, wurde die Probe unter geänderten chromatographischen Bedingungen erneut fraktioniert (s. Abbildung 34). In der im ELISA positiven Fraktion wurde mit Hilfe von hochauflösender Massenspektrometrie ein Molekülionenpeak mit der Summenformel  $[C_{21}H_{26}ClN_2O_3]^+$

ermittelt, der nach einer Datenbanksuche in SciFinder [322] als Cetirizin identifiziert wurde. Nachfolgende Untersuchungen mit Cetirizin bestätigten die Kreuzreaktion des Antikörpers mit dieser Substanz.

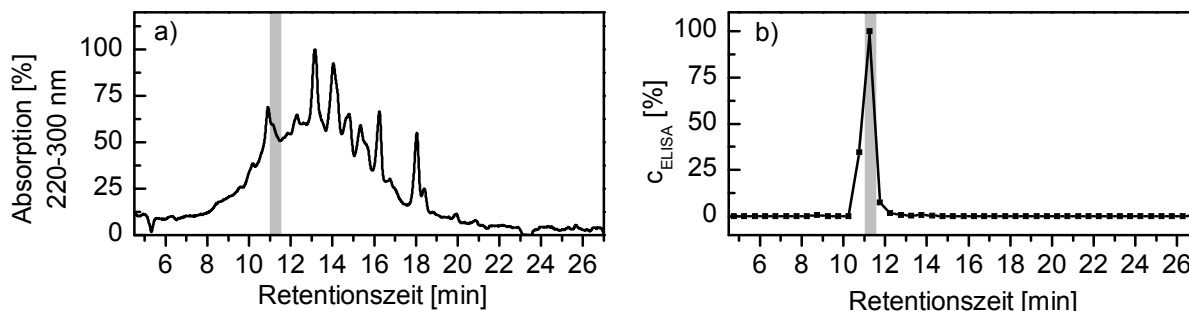


Abbildung 34: Peak VIII (s. Abbildung 33) wurde gesammelt und unter geänderten chromatographischen Bedingungen analysiert. LC-DAD UV (a) und LC-ELISA (b) sind abgebildet. Die grau unterlegte Fraktion wurde mit hochauflösender MS weitergehend analysiert.

#### 4.4.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Kreuzreaktivität

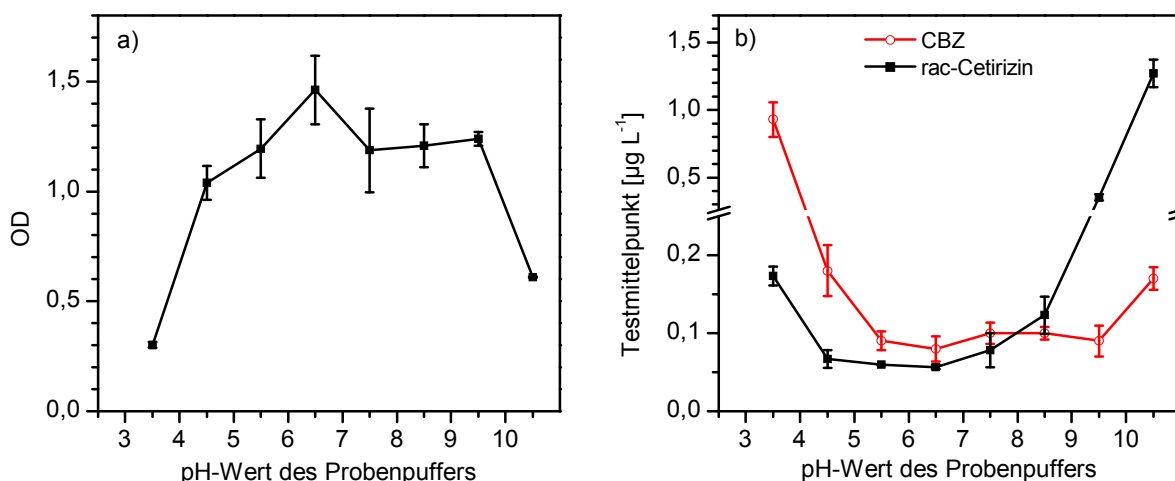


Abbildung 35: Kalibrierkurven von CBZ und Cetirizin wurden bei acht verschiedenen pH-Werten bestimmt. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Signalstärke (a) und der Testmittelpunkte (b) vom pH-Wert. Beide Abbildungen zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Experimenten.

Cetirizin besitzt zwei Amino-Gruppen und eine Carbonsäure-Gruppe, die in Abhängigkeit vom pH-Wert protoniert bzw. deprotoniert werden ( $pK_a = 2,2; 2,9; 8,0$  [313]). Daher wurde untersucht, welche Auswirkungen ein veränderter pH-Wert auf Selektivität und Sensitivität des ELISAs hat. Hierzu wurden acht verschiedene Probenpuffer im pH-Bereich zwischen 3,5 und 10,5 untersucht.

Die Signalstärke (A-Wert der Kalibrierfunktion) war im pH-Bereich zwischen 4,5 und 9,5 annähernd konstant (s. Abbildung 35a). Außerhalb dieses Bereichs nahm das Signal rasch ab, was vorwiegend auf die Denaturierung des Enzyms zurückzuführen sein dürfte.

Zudem hatte der pH-Wert einen deutlichen Einfluss auf die Selektivität des Antikörpers. Beim Wechsel von neutralem zu basischem pH-Wert sank die Affinität des Antikörpers gegenüber Cetirizin, während sie für CBZ annähernd konstant blieb (s. Abbildung 35b).

Für dieses Verhalten kann die Deprotonierung von Cetirizin verantwortlich gemacht werden. Unter neutralen Bedingungen bildet Cetirizin ein Zwitter-Ion, das eine negative Ladung an der Carbonsäure und eine positive Ladung am Piperazin-Ring trägt. Letztere wird oberhalb von pH 8 überwiegend deprotoniert, so dass ein Anion zurückbleibt. Der Kehrwert des Testmittelpunkts, der als Maß für die Affinität des Antikörpers interpretiert werden kann, zeigt eine vergleichbare pH-Abhängigkeit wie der Molenbruch des Zwitterions von Cetirizin. Hieraus lässt sich ableiten, dass das Zwitterion maßgeblich verantwortlich ist für die Kreuzreaktivität von Cetirizin (s. Abbildung 36).

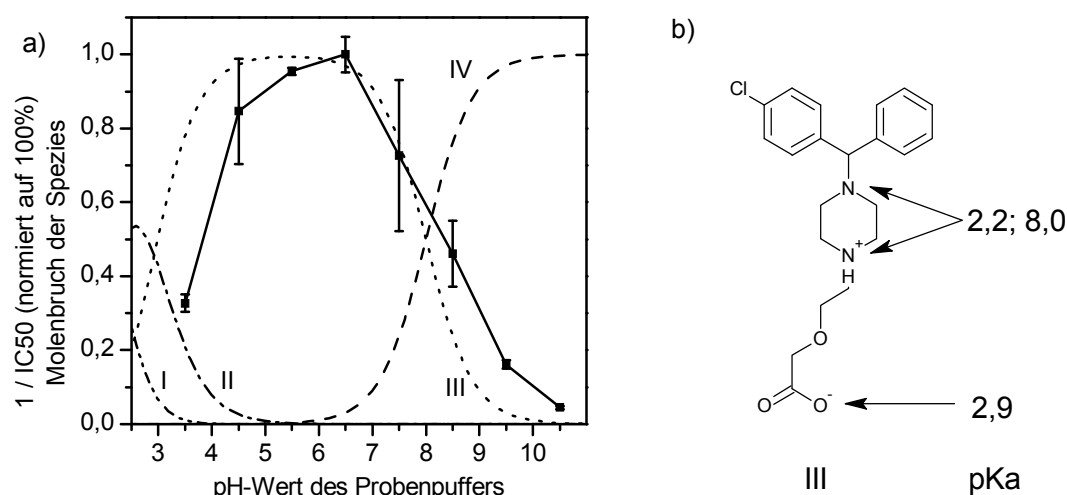


Abbildung 36:a) Normierter, reziproker IC<sub>50</sub>-Wert von Cetirizin und Molenbrüche der Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert des Probenpuffers (Spezies I: Dikation; II: Kation; III: Zwitter-Ion; IV: Anion; Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Experimenten); b) Struktur von Cetirizin (Spezies III) mit pK<sub>a</sub>-Werten.

Darüber hinaus war ein Einfluss des pH-Wertes auf die Selektivität des Antikörpers festzustellen. Die Affinität des Antikörpers gegenüber CBZ nahm unterhalb von pH 6,5 ab, während sie gegenüber Cetirizin annähernd konstant blieb. Da CBZ über den gesamten betrachteten pH-Bereich unpolar ist (pK<sub>a,1</sub> ≤ 1; pK<sub>a,2</sub> = 13,9 [323, 324]), deutet dies auf eine Veränderung des Antikörpers selbst hin. Es ist gut möglich, dass die Bindungstasche eine oder mehrere Aminosäuren enthält, die im fraglichen pH-Bereich protoniert bzw. deprotoniert werden (z. B. Asparaginsäure oder Glutaminsäure). Diese Polaritätsveränderung kann für die geringere Bindungstendenz an CBZ verantwortlich sein. Dass Cetirizin hiervon weniger betroffen ist, kann sterische Gründe haben oder durch eine zumindest teilweise unterschiedliche Bindungsstelle bedingt sein.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Bestimmung des pH-Wertes zwei systematischen Fehlern unterliegt. Zum einen wurde der pH-Wert mit einer Glaselektrode gemessen, die in Lösungen mit hohen Natrium-Konzentrationen an Zuverlässigkeit verliert. Zum anderen wurde der Probenpuffer durch die Probenzugabe um den Faktor 4 verdünnt, was allein schon eine Veränderung des pH-Wertes um mehrere Zehntel verursachen kann. Daher sind die Kurven in Abbildung 35 und Abbildung 37 möglicherweise im Detail nicht korrekt, der generelle Trend dürfte jedoch zutreffen.

Weiterhin wurde für weitere Arzneimittel und Metaboliten untersucht, wie sich eine Änderung des pH-Wertes auf die Kreuzreaktivitäten auswirkt (s. Abbildung 37). Die für die



Ergebnisdiskussion nötigen  $pK_a$ -Werte sind in Tabelle 19 aufgeführt. Soweit verfügbar wurde auf experimentelle Werte zurückgegriffen, in den übrigen Fällen wurde die Berechnung der  $pK_a$ -Werte mit einer Software durchgeführt [325]. Die benutzte Software erzielte in einer Vergleichsstudie zwar die besten Resultate [326], hat aber auch Schwächen. So wurde beispielsweise für Oxcarbazepin ein  $pK_a$ -Wert errechnet, der mit 13,9 deutlich vom experimentellen Wert (10,7) abwich.

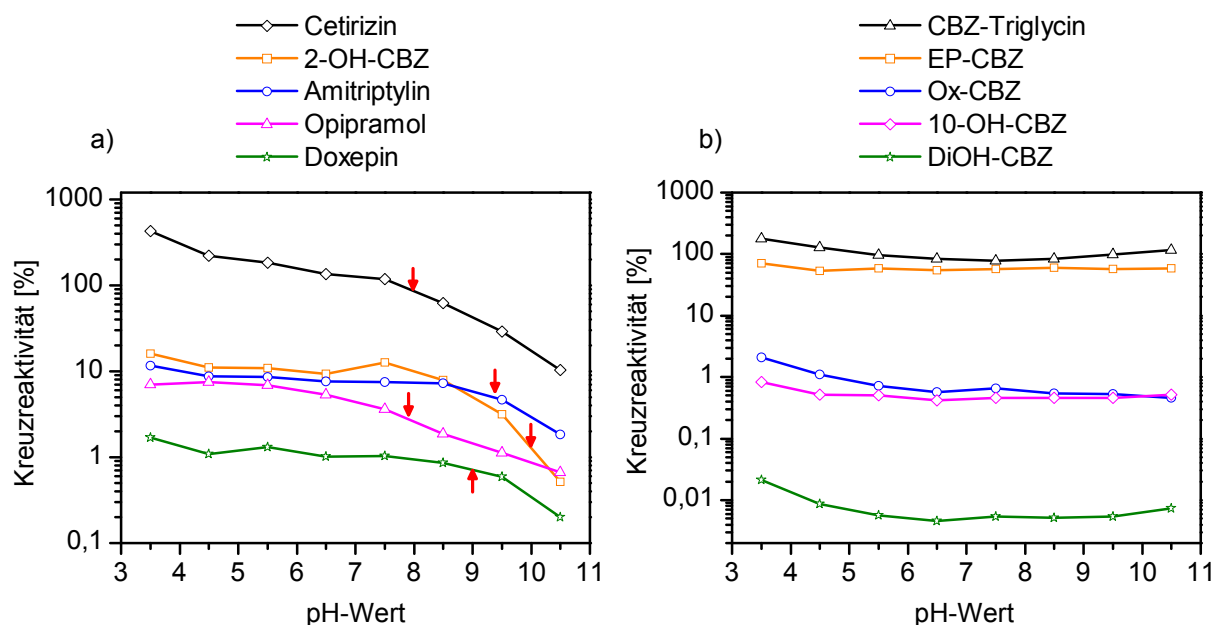


Abbildung 37: Abhängigkeit der Kreuzreaktivität vom pH-Wert des Probenpuffers. a) Verbindungen ohne Polaritätswechsel im dargestellten pH-Bereich; b) Verbindungen mit Polaritätswechsel. Die jeweiligen  $pK_a$ -Werte sind mit einem roten Pfeil markiert. Werte wurden je einmal gemessen.

Die Substanzen Cetirizin, Amitriptylin, Opipramol, Doxepin und 2-OH-CBZ zeigten im sauren und neutralen pH-Bereich eine weitgehend konstante Kreuzreaktivität (s. Abbildung 37a). Im basischen Milieu nahm hingegen in allen Fällen die Kreuzreaktivität stark ab. Die Abnahme der Kreuzreaktivität fiel dabei ungefähr mit dem  $pK_a$ -Wert zusammen.

Im Gegensatz dazu war die Kreuzreaktivität gegenüber EP-CBZ, Ox-CBZ, 10-OH-CBZ, DiOH-CBZ sowie dem Hapten CBZ-Triglycin über den gesamten untersuchten pH-Bereich relativ konstant (s. Abbildung 37b). Dies ist damit zu erklären, dass diese Substanzen, mit Ausnahme von Ox-CBZ ( $pK_a$  10,7), keinen Polaritätswechsel im untersuchten pH-Bereich zeigten. Ox-CBZ ist gesondert zu betrachten, da es mit ca. 0,5 % CBZ verunreinigt war. Nach Abzug dieses Sockelbetrags von 0,5 % ergibt sich mit steigendem pH-Wert eine Verminderung der Kreuzreaktivität von 0,7 % bei pH 4,5 auf 0,04 % bei pH 10,5, so dass Ox-CBZ de facto der ersten Gruppe zuzurechnen ist.

In fast allen Fällen war bei pH 3,5 ein leichter Anstieg der Kreuzreaktivität zu beobachten. Bei diesem pH-Wert ist also nicht nur die Affinität des Antikörpers gegenüber CBZ vermindert (s. Abbildung 35a), sondern auch seine Selektivität. Ähnliches war bei pH 10,5 für die Substanzen mit konstanter Polarität zu beobachten.

Es bleibt festzuhalten, dass zum einen der Ladungszustand des Antikörpers von Bedeutung ist. Dies zeigt sich im sauren pH-Bereich an der Affinitätsveränderung des Antikörpers

gegenüber CBZ, das über den gesamten untersuchten pH-Bereich unpolar ist. Zum anderen ist auch der Ladungszustand des Liganden von Bedeutung, was sich in der pH-abhängigen Kreuzreaktivität von Cetirizin und zahlreichen weiteren Substanzen äußert.

Bei pH 10,5 waren die Kreuzreaktivitäten der meisten Substanzen am geringsten, so dass dieser pH-Wert besonders günstig für die Analyse von Gewässerproben ist.

#### 4.4.4 Beziehung zwischen chemischer Struktur und Kreuzreaktivität

Auf den ersten Blick ist es erstaunlich, dass der Antikörper sowohl verschiedene trizyklische Verbindungen als auch Stoffe mit Diphenylmethyleinheit bindet. Um diesen ungewöhnlichen Sachverhalt näher zu beleuchten, werden im Folgenden zunächst die Topologien dieser Verbindungen verglichen. Weiterhin wird der Zusammenhang zwischen Ladungsverteilung und der Antikörperaffinität untersucht, wobei insbesondere der Einfluss des pH-Wertes und die dabei auftretenden Ladungsverschiebungen von Interesse sind.

##### *Ähnlichkeiten im Strukturgerüst*

Um topologische Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufzuzeigen, wurden soweit verfügbar die Kristallstrukturen der Kreuzreaktanden mit derjenigen von CBZ verglichen. Hierbei ist Vorsicht angebracht, da die Struktur eines Stoffes in fester Phase nicht zwangsläufig identisch mit der Struktur in der Flüssigphase ist. Die Übereinstimmung zwischen Konformation in fester und flüssiger Phase ist dann besonders hoch, wenn die bestimmenden Kräfte intramolekular wirken und nicht durch die Umgebung bestimmt werden (d.h. durch das Lösungsmittel bzw. die Kristallumgebung). Die Übertragbarkeit hängt auch von der Flexibilität der Strukturen ab, für rigide Systeme wie das trizyklische Dibenz[*b,f*]azepin-Grundgerüst sind gute Vorhersagen zu erwarten.

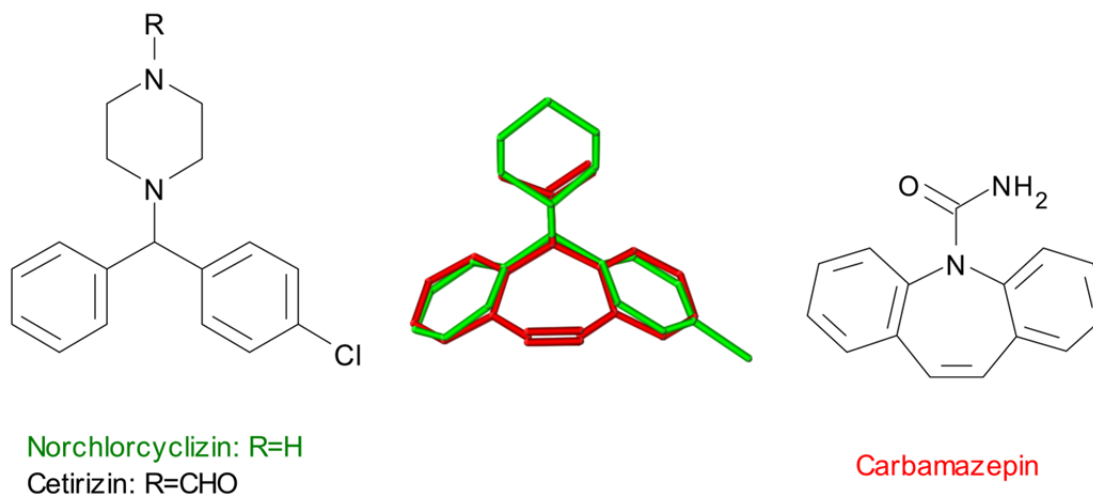


Abbildung 38: Überlagerung der Kristallstrukturen von Norchlorcyclizin (grün) und CBZ (rot)

Die Ähnlichkeit zwischen CBZ und Norchlorcyclizin, einem Derivat von Cetirizin, lässt sich in Abbildung 38 erkennen, die die Überlagerung beider Kristallstrukturen [68, 327] mit Hilfe eines Algorithmus von Hougardy et al. zeigt [328]. In beiden Stoffen nehmen sowohl die

Phenyleinheiten als auch die Carboxamid- bzw. Piperazin-Gruppe eine ähnliche Ausrichtung ein.

Beide Phenyleinheiten sind für eine erfolgreiche Bindung an den Antikörper unabdingbar. Ist wie in 4-Chlorphenylharnstoff bei ansonsten ähnlicher Struktur nur eine Phenyleinheit vorhanden, sinkt die Kreuzreaktivität drastisch auf 0,001 % ab. Dieser Wert ist niedrig, aber immer noch deutlich höher als bei Benzoyllecgonin, Harnstoff und Triglycin, die aufgrund ihrer völlig unterschiedlichen Struktur als Negativkontrolle gelten können.

Für einen systematischen Vergleich wurden für zehn trizyklische Verbindungen und acht Diphenylmethyl-Verbindungen die in Kapitel 2.1 eingeführten Winkel und Abstände bestimmt (s. Tabelle 20).

*Tabelle 20: Anhand der Kristallstrukturen wurden der Biegungswinkel  $\alpha$  der Anellierungswinkel  $\beta$  der Torsionswinkel  $\gamma$  sowie der Abstand der Phenylringe  $\delta$  bestimmt. Soweit mehrere Konformere pro Elementarzelle vorhanden sind, sind diese getrennt nebeneinander aufgeführt. Von einigen Substanzen war nur die Kristallstruktur eines Salzes (z. B. eines Pikrats) bekannt.*

Name	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta(\text{\AA})$	Referenz
<i>Trizyklische Verbindungen</i>					
CBZ Form III	53°	30°	3°	4,84	[68]
EP-CBZ	64°	30°	1°	4,70	[72]
Iminostilben	35°	31°	0°	5,05	[329]
Opipramol	50°	30°	4°	4,87	[330] (Dipikrat)
DiH-CBZ Form I/II	62°/61°	28°/26°	18°/19°	4,78/4,82	[331]/[332]
10-OH-CBZ	51°	28°	19°	4,93	[333]
Ox-CBZ	63°	27°	17°	4,77	[334]
Amitriptylin	51°	24°	19°	5,03	[335] (Pikrat)
Desloratadin	56°	29°	13°	4,85	[336]
Imipramin*	50°/58°	25°/24°	19°/9°	4,96/4,79	[337] (Hydrochlorid)
<i>Diphenylmethyl-Verbindungen</i>					
Diphenhydramin	78°	45°	4°	4,63	[338]
Norchlorcyclizin	64°	30°	1°	4,87	[327]
p,p'-DDT	65°	27°	30°	4,94	[339]
o,p-DDT*	89°/80°	26°/26°	47°/31°	4,78/4,77	[339]
(R)-Cetirizin*	83°/77°	33°/42°	26°/30°	4,71/4,84	[340] (Dipikrat)
Benzhydrylamin	82°	37°	40°	4,87	[341]
Cloperastin	90°	31°	52°	4,88	[342] (Fendisoat)
Diphenylamin	47	11	41	5,09	[343]

\*Elementarzelle enthält zwei verschiedene Konformere

Die trizyklischen Verbindungen lassen sich unterteilen in Verbindungen mit und ohne Doppelbindung in 10,11-Position. CBZ, EP-CBZ, Opipramol und Iminostilben besitzen diese Doppelbindung, das Dibenzazepengerüst ist hier annähernd spiegelsymmetrisch. Aufgrund des fehlenden Substituenten weicht Iminostilben am wenigsten von einer planaren Struktur ab. Bei Opipramol, CBZ und EP-CBZ führt der zunehmende Raumbedarf der Substituenten

zu höheren Biegungswinkeln sowie zu einem geringeren Abstand zwischen den Benzoleinheiten.

Mit Einführung der Einfachbindung in 10,11-Position geht die Spiegelsymmetrie verloren. Es kommt zu einer Verdrillung der Bindung zwischen C(10) und C(11) sowie zu einer Torsion zwischen den Bindungen C(4a)-N(5) und N(5)-C(5a), die sich auf die angrenzenden Phenyleinheiten überträgt (10-OH-CBZ, DiH-CBZ, Ox-CBZ, Desloratadin, Amitriptylin, Imipramin). Die höhere Flexibilität des Dihydroazepins erlaubt eine leichte Vergrößerung des Abstandes zwischen den Benzoleinheiten und eine Abnahme des Anellierungswinkels  $\beta$  gegenüber den Strukturen mit Doppelbindung.

Aus der Verknüpfung dieser Feststellungen und den Kreuzreaktivitäten aus Tabelle 19 lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Die Ligandenbindung ist unempfindlich gegenüber leichten Veränderungen des Biegungswinkels und des Torsionswinkels. Dies lässt sich aus DiH-CBZ und EP-CBZ schließen, die trotz höheren Biegungswinkels und im Fall von DiH-CBZ ebenfalls höheren Torsionswinkels sehr hohe Kreuzreaktivitäten von etwa 100 % bzw. 70 % aufweisen. Interessant ist weiterhin, dass die Hydrierung bzw. Epoxidierung in 10,11-Position in diesen beiden Fällen wenig Einfluss auf die Bindung hat.

Aufgrund obiger Ausführungen erscheint es weiterhin wahrscheinlich, dass die sehr geringe Kreuzreaktivität von Iminostilben nicht auf den geringeren Biegungswinkel, sondern auf das Fehlen des Substituenten am Stickstoffatom des Trizyklus zurückzuführen ist. Ein weiteres Indiz für die entscheidende Bedeutung dieses Substituenten ist, dass die Arzneimittel Opipramol, Imipramin, Amitriptylin und Loratadin eine höhere Kreuzreaktivität zeigen als Iminostilben. Diese Substanzen tragen an dieser Position statt einer Carbamoylgruppe verschiedene organische Reste.

Die für die trizyklischen Verbindungen definierten Winkel lassen sich auch für die Diphenylmethyl-Verbindungen bestimmen. Allerdings besitzen diese Werte aufgrund der hohen Flexibilität der Phenyleinheiten [344] weniger Aussagekraft als es bei den rigiden trizyklischen Verbindungen der Fall ist.

Diese Flexibilität der Phenyleinheiten lässt sich anschaulich am Torsionswinkel  $\gamma$  ablesen. In Diphenhydramin und Norchlorcyclizin stehen die Phenylringe einander fast spiegelsymmetrisch gegenüber, was sich in einem geringen Torsionswinkel widerspiegelt. Bei Cloperastin sind diese Ringe hingegen stark gegeneinander verdreht ( $\gamma = 52^\circ$ ) und die Benzoleinheiten stehen senkrecht zueinander ( $\alpha = 90^\circ$ ). Die übrigen Diphenylmethyl-Verbindungen lassen sich als Mischformen aus diesen beiden Konstellationen beschreiben. Auffällig ist, dass die Kristallstrukturen von Norchlorcyclizin und (R)-Cetirizin trotz sehr ähnlicher Struktur verschiedene Konformationen einnehmen. Die Phenylringe sind demnach relativ frei drehbar. Die hohe Flexibilität der Phenylringe lässt sich auch daran erkennen, dass bei (R)-Cetirizin und o,p-DDT in einer Elementarzelle jeweils zwei verschiedene Konformere mit unterschiedlichen Ringanordnungen vorliegen.

Im Kristall liegt also keine eindeutig günstige Konformation vor, in gelöster Form trifft vermutlich Ähnliches zu. Aufgrund der relativ großen Flexibilität ist anzunehmen, dass die beiden Phenylringe mit geringem Energieaufwand in die Position gelangen können, die für die Bindung an den Antikörper nötig ist.

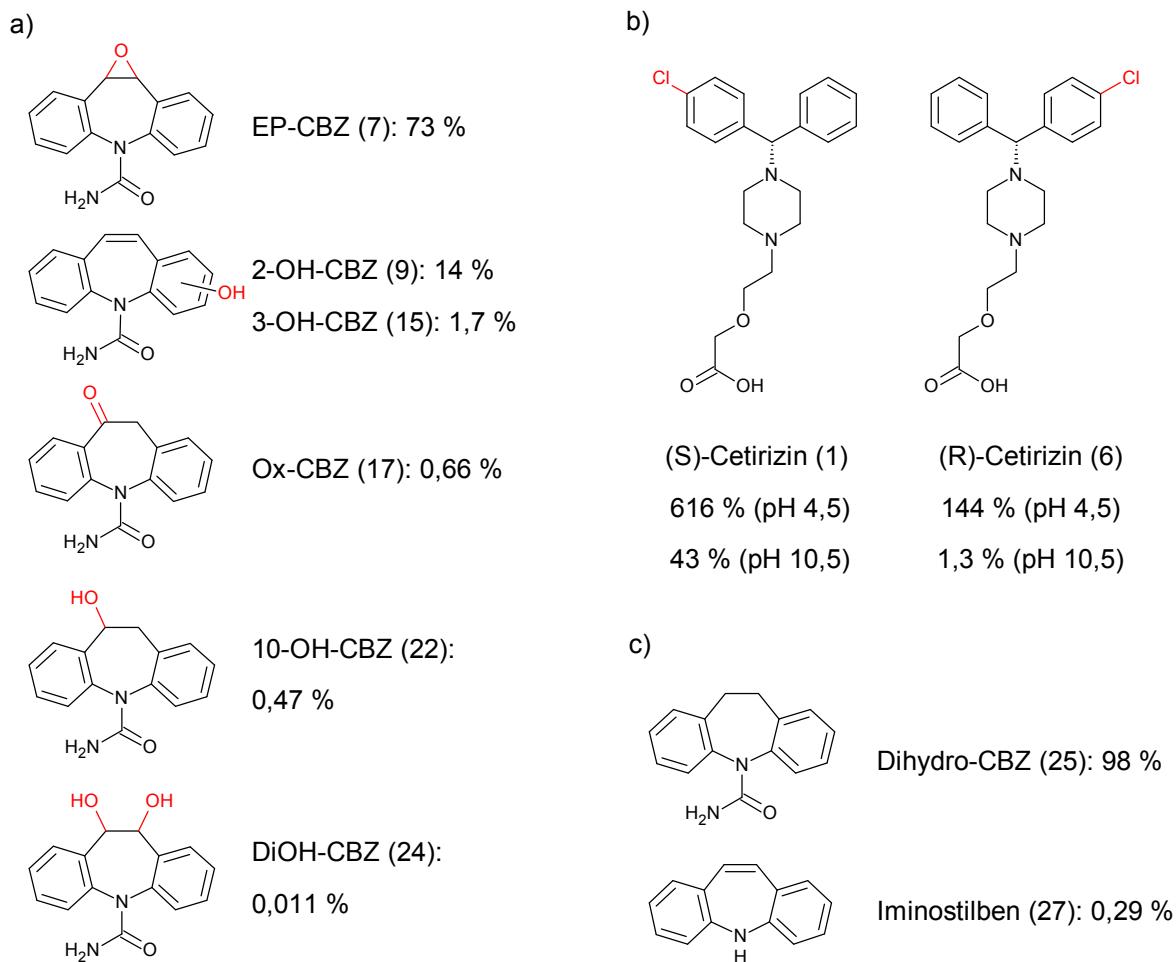


Abbildung 39: Strukturen einiger Kreuzreaktanden mit Angabe der Kreuzreaktivitäten. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Werte bei pH 7,6 (mit BSA-Zugabe) ermittelt. In Klammern befindet sich die Nummerierung wie in Tabelle 19.

### Einfluss von Substituenten

Folgende empirisch aufgestellte Regeln ergaben sich nach eingehender Analyse der Kreuzreaktivitäten:

- Polare Substituenten am trizyklischem Gerüst führen zu geringerer Kreuzreaktivität

In allen untersuchten Fällen führte eine Substitution an der Brücke zwischen den Phenylringen (10,11-Position) zu einer geringen Kreuzreaktivität von weniger als 1 % (Ox-CBZ, 10-OH-CBZ und DiOH-CBZ, s. Abbildung 39). Auch bei einer Substitution an den aromatischen Ringbestandteilen wie bei 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ wurden relativ geringe Kreuzreaktivitäten gefunden, die sich durch Deprotonierung bei stark basischem pH-Wert weiter verminderten. Die höchste Kreuzreaktivität der substituierten Derivate zeigte EP-CBZ mit ca. 70 % Kreuzreaktivität, dessen Epoxy-Gruppe auch die geringste Polarität aufwies.

- Positive Ladung an der Seitenkette in  $\delta$ -Position fördert Ligandenbindung

Zahlreiche untersuchte Stoffe besitzen eine Seitenkette, die sich an der einatomigen Brücke zwischen den Phenyl-Einheiten befindet. In vielen Fällen sitzt im Abstand von vier Atomen vom Brückenatom eine Aminogruppe in dieser Kette. Diese Aminogruppe ist im Allgemeinen

bei pH 4,5 protoniert, während sie bei pH 10,5 deprotoniert ist. In der Regel band die protonierte Form deutlich besser an den Antikörper. Dieser Effekt trat sowohl bei primären, sekundären als auch tertiären Aminen auf, bei Amitriptylin, Imipramin, Opipramol, Doxepin, Diphenhydramin, Cloperastin, Hydroxyzin, Norchlorcyclizin und Cetirizin. Einzige Ausnahme war Loratadin, bei dem die Kreuzreaktivität im sauren pH-Bereich geringer war. Dieses abweichende Verhalten ist vermutlich auf die Doppelbindung zurückzuführen, mit der die Piperidin-Gruppe mit dem Trizyklus verknüpft ist. Durch die deutlich verminderte Flexibilität wird das Ammonium-Ion vermutlich in eine antibindende Lage gezwungen.

- Positive Ladung an der Seitenkette in  $\alpha$ -Position erschwert Ligandenbindung

Im sauren pH-Bereich tragen Benzhydrylamin, 4-Chlorbenzhydrylamin und (Diphenylmethyl)methylamin eine positive Ladung in direkter Nachbarschaft zum zentralen Kohlenstoffatom ( $\alpha$ -Position). Die Entfernung dieser Ladung bei pH 10,5 führte in allen drei Fällen zu einer deutlichen Erhöhung der Kreuzreaktivität um das bis zu Siebenfache.

- Ein Chlor-Substituent am Phenyl-Ring in para-Stellung fördert Ligandenbindung

Gegenüber den unsubstituierten Molekülen führte das Vorhandensein der Chlor-Substituenten in den Verbindungen 4-Chlorbenzhydrol und 4-Chlorbenzhydrylamin zu einer Zunahme der Kreuzreaktivität, abhängig vom pH-Wert bis zu einem Faktor von 13. Eine vergleichbare Beobachtung konnte bei den strukturell ähnlichen Verbindungen Diphenhydramin und Cloperastin gemacht werden. Es liegt nahe, dass die etwa sechsmal höhere Kreuzreaktivität von Cloperastin auf den Chlor-Substituenten zurückzuführen ist, der in Diphenhydramin nicht vorhanden ist.

Interessanterweise ist in prochiralen Verbindungen bedeutsam, an welchem der beiden Phenylringe der Chlor-Substituent gebunden ist: Die Affinität des Antikörpers gegenüber (R)-Cetirizin war erheblich geringer als gegenüber (S)-Cetirizin (s. Abbildung 39 b). Der Antikörper ist also enantioselektiv. Dass Enantiomere Unterschiede im Bindungsverhalten zu Antikörpern aufweisen können, hat Landsteiner bereits 1928 gezeigt [345].

- Spezies des Ringatoms 5 kann C oder N sein

Das Stickstoffatom N(5), das bei CBZ die beiden Phenylringe verbrückt, besitzt nur eine geringe Bedeutung für die Ligandenbindung. So war die Kreuzreaktivität von Protriptylin und Amitriptylin, bei denen sich an dieser Position ein Kohlenstoffatom befindet, ähnlich hoch wie bei den verwandten Strukturen Opipramol und Imipramin.

Diese Regeln sind in Abbildung 40 zusammengefasst und grafisch veranschaulicht.

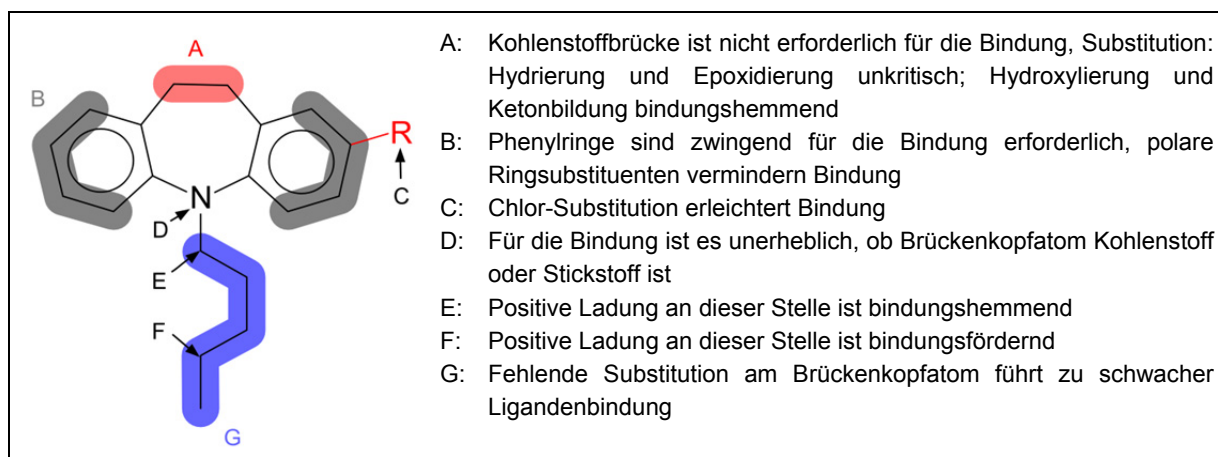


Abbildung 40: Zusammenfassende Beschreibung der Strukturmerkmale, die für die Ligandenbindung von Bedeutung sind.

Die aufgeführten Regeln sind geeignet, die Kreuzreaktivität von weiteren potentiellen Kreuzreaktanden abzuschätzen. Beispielsweise ist eine signifikante Kreuzreaktivität des Arzneimittels Chlorphenamin nicht auszuschließen. Aufgrund der Ähnlichkeit mit 4-Chlorbenzhydrylamin ist für diese Substanz eine erhebliche Kreuzreaktivität im mindestens einstelligen Prozentbereich anzunehmen. Die Aminogruppe ist bei Chlorphenamin vorteilhafterweise weiter von den Phenylringen entfernt als bei 4-Chlorbenzhydrylamin. Das Heteroatom in einem der Phenylringe wirkt sich dagegen möglicherweise nachteilig aus, ähnlich wie in Loratadin.

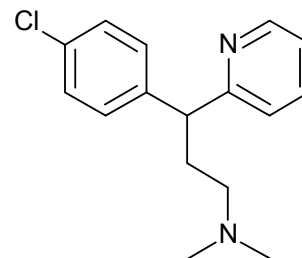


Abbildung 41:  
Chlorphenamin

Chlorphenamin wird unter anderem in der Veterinärmedizin angewendet und steht auf der Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der Weltgesundheitsorganisation WHO. Über die Verbreitung dieses Arzneimittels in der Umwelt ist wenig bekannt. Die Untersuchungen von Abwasser mit dem LC-ELISA lassen darauf schließen, dass in Deutschland durch diese Substanz keine Störung des ELISAs zu erwarten ist. Für den Einsatz in anderen Ländern ist diese Bewertung zu reevaluieren. Das Beispiel Chlorphenamin mag daher als Beleg dienen, dass ein LC-ELISA die wohl belastbarsten Aussagen über die Bedeutsamkeit von Kreuzreaktanden in der zu untersuchenden Matrix zu liefern vermögen.

#### 4.4.5 Beurteilung der Kreuzreaktionen für die Gewässeranalyse mit dem CBZ-ELISA

Der Wert eines Immunoassays steht und fällt mit der Selektivität des Antikörpers. Eventuelle Kreuzreaktivitäten sind in der Praxis nur dann ein Problem, wenn die entsprechende Substanz in der zu untersuchenden Probe mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit und in nennenswerter Konzentration vorkommt. In diesem Abschnitt sollen die gemessenen Kreuzreaktivitäten mit den in der Umwelt zu erwartenden Konzentrationen verknüpft werden, um die Eignung des Messsystems für dieses Einsatzfeld zu beurteilen.

### Arzneimittel

Um die zu erwartenden Konzentrationen in der Umwelt abschätzen zu können, lassen sich aus den Verschreibungszahlen der gesetzlichen Krankenkassen sowie den vom Bundesministerium für Gesundheit empfohlenen Tagesdosen die in die Umwelt eingebrachten Stoffmengen abschätzen. Tabelle 21 zeigt die Mengen an Arzneimitteln, die im Jahr 2009 von den gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland verschrieben wurden. Zu beachten ist, dass es sich bei der empfohlenen Tagesdosis nur um einen Richtwert handelt, der von der Indikation abhängt und im Einzelfall vom behandelnden Arzt festzusetzen ist, so dass die tatsächlich in die Umwelt eingebrachten Werte erheblich von den hier angegebenen Werten abweichen können.

Aus den Verschreibungszahlen geht hervor, dass deutlich größere Mengen an CBZ verschrieben werden als von allen anderen strukturverwandten Arzneimitteln. Dies ist vor allem der sehr hohen Tagesdosis von 1000 mg zuzuschreiben. Auch in der Summe ist die Menge der trizyklischen Arzneimittel Opipramol, Amitriptylin, Doxepin, Imipramin, Clomipramin, Trimipramin, Nortriptylin und Loratadin zu gering, um angesichts der niedrigen molaren Kreuzreaktivitäten von weniger als 2,2 % bei pH 10,5 die CBZ-Bestimmung signifikant zu beeinflussen.

*Tabelle 21: Anzahl der von den gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland 2009 verschriebenen definierten Tagesdosen (DDD) [54], die Höhe der empfohlenen Tagesdosen [52], die aus diesen Daten resultierende insgesamt verbrauchte Menge sowie die spezifische (massenbezogene) Kreuzreaktivität CR bei pH 10,5 für ausgewählte Wirkstoffe mit struktureller Ähnlichkeit zu CBZ.*

Wirkstoff	DDD [Mio]	Tagesdosis [mg]	Gesamtverbrauch [t]	CR [%]
<i>verschreibungspflichtige Wirkstoffe</i>				
Carbamazepin	58	1000	58	100
Oxcarbazepin	12,9	1000	12,9	0,50
Opipramol	74	150	11,1	0,78
Amitriptylin	94,5	75	7,1	1,5
Doxepin	54,2	100	5,4	0,22
Trimipramin	31,6	150	4,7	
Clomipramin	8,1	100	0,81	
Hydroxyzin	3,9	75	0,29	15
Imipramin	2,6	100	0,26	1,2
Nortriptylin	2,5	75	0,19	
Desloratadin	20,3	5	0,10	
Levocetirizin	18,9	5	0,095	0,70
<i>nicht verschreibungspflichtige Wirkstoffe:</i>				
Cetirizin	13,2	10	0,13	14
Diphenhydramin	0,3	50-300	< 0,09	1,2
Loratadin	0,7	10	0,007	1,3

Schwierig wird die Beurteilung bei nicht verschreibungspflichtigen Arzneimitteln. Diese sind in den Verschreibungsdaten der gesetzlichen Krankenkassen nur am Rande erfasst, weil



Kindern unter 12 Jahren sowie Jugendlichen unter 18 Jahren mit Entwicklungsstörung diese Arzneien erstattet werden. Die tatsächlichen Verkaufszahlen dürften in Summe um ein Vielfaches höher liegen. Neben Cetirizin, Diphenhydramin und Loratadin fallen hierunter auch die stark sedierenden Antihistaminika Chlorphenamin und Doxylamin, die auch als Schlafmittel in Gebrauch sind. Die Verwendung in rezeptfreien Kombipräparaten (z. B. Wick MediNait, Grippostad, etc.) macht den Stoffeintrag in die Umwelt schwer nachvollziehbar.

Das Auftreten der kreuzreagierenden Arzneimittel in Abwässern und Oberflächengewässern ist zum Teil schon untersucht worden (s. Tabelle 22). Für Deutschland liegen bislang nur für Amitriptylin, Cetirizin, Doxepin und Opipramol Daten vor. In geklärtem Abwasser, das den maßgeblichen Eintragspfad in die Umwelt darstellt, wurde für jeden dieser Stoffe eine deutlich geringere Konzentration als für CBZ gefunden. Da die spezifische Kreuzreaktivität bei pH 10,5 für alle Stoffe 15 % oder weniger beträgt, sind nur sehr geringe Überbestimmungen zu erwarten.

Tabelle 22: Auftreten von Arzneimitteln in Gewässern (Oberfl.wasser: Oberflächenwasser)

Substanz	Land	Gemessene Höchstkonzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]			Ref.
		Oberfl.wasser	Klärwerkszulauf	Klärwerksablauf	
Amitriptylin	Deutschland	<LOQ (0,01)		0,032	[346]
	USA		>2	1,5	[347]
	USA			0,086	[348]
	Wales	0,021	6,7	0,40	[349, 350]
	Kanada	0,004	0,021	0,021	[351]
	Japan	<LOQ (0,0005)		0,014	[352]
	Spanien		0,21	0,12	[353]
	Frankreich	<LOQ (0,002)		0,006	[354]
	Deutschland	0,020		0,11	[279]
Cetirizin	Finnland	0,008	1,6	1,3	[355]
	Norwegen			0,7	[356]
	Spanien		3,6	0,55	[357]
	Schweden		0,22	0,28	[358]
	Indien	530		2100	[359]
	Spanien		<LOQ (0,0002)	<LOQ (0,0002)	[357]
Diphenhydramin	USA	0,10			[360, 361]
Doxepin	Deutschland	0,22		0,36	[174]
	Frankreich	<LOQ (0,002)		<LOQ (0,017)	[354]
Hydroxyzin	Australien		ca. 0,3	ca. 0,03	[362]
Imipramin	Spanien		0,048	0,055	[353]
	Frankreich	<LOQ (0,001)		<LOQ (0,013)	[354]
Loratadin	Spanien		0,33	<LOQ (0,015)	[357]
Opipramol	Deutschland	<LOQ (0,01)		<LOQ (0,01)	[346]
Oxcarbazepin	Frankreich		0,51	0,26	[179]

In anderen Ländern wurden teilweise beträchtliche Unterschiede zur Situation in Deutschland beschrieben, die vor allem auf eine unterschiedliche Verschreibungspraxis zurückzuführen sein dürften. So sind in den USA und Wales sehr hohe Abwasser-

konzentrationen von Amitriptylin gefunden worden. In den USA waren diese Konzentrationen bis zu zehnmal höher als die Konzentrationen von CBZ [347]. Bei der Quantifizierung von CBZ mit dem ELISA ergäbe sich hierdurch eine deutliche, aber immer noch akzeptable Überbestimmung von ca. 15 %.

Die Konzentrationen an Cetirizin und auch Hydroxyzin waren in allen untersuchten Ländern höher als in Deutschland. In Spanien wurden in ungeklärtem Abwasser Konzentrationen gemessen, die bis zu 40 Mal höher waren als die Konzentrationen von CBZ [357]. Hier ist eine deutliche Überbestimmung um ein Vielfaches zu erwarten.

Darüber hinaus wurden in einigen Ländern relativ geringe Mengen an Diphenhydramin, Imipramin, Loratadin und Oxcarbazepin gefunden, die aufgrund der geringen Kreuzreaktivitäten dieser Substanzen wenig problematisch für den Einsatz des CBZ-ELISAs sind.

### *Metaboliten*

Es existieren nur wenige Studien über die Verbreitung der CBZ-Metaboliten in Oberflächengewässern. Bisher wurden nur DiOH-CBZ [174-176] und EP-CBZ [180] nachgewiesen. Besser untersucht sind die Konzentrationen in Abwässern, die darauf schließen lassen, dass außer DiOH-CBZ alle Metaboliten in deutlich niedrigerer Konzentration als CBZ auftreten (s. Tabelle 6). Aus den vorliegenden Daten ergibt sich, dass entweder die Kreuzreaktivitäten oder die Konzentrationen der Metaboliten zu gering sind, um die Bestimmung von CBZ in Wasserproben mit dem ELISA zu beeinflussen. Einzig durch die Präsenz von EP-CBZ sind Überbestimmungen von mehr als 1 % zu erwarten, da dieser Stoff eine hohe Kreuzreaktivität zeigt und in relevanten Konzentrationen in Gewässern auftritt.

### *Zusammenfassende Beurteilung*

In deutschen Oberflächengewässern und Abwässern ist aufgrund der Präsenz von EP-CBZ mit einer systematischen Überbestimmung durch den CBZ-ELISA im einstelligen Prozentbereich zu rechnen. Bei einer Durchführung des ELISAs bei pH 10,5 ist ein vernachlässigbar geringer Einfluss des Kreuzreaktanden Cetirizin sowie aller übrigen untersuchten Arzneimittel zu erwarten.

Beim Einsatz des Tests im Ausland besteht das Risiko, dass aufgrund einer abweichenden Verschreibungspraxis höhere Überbestimmungen auftreten. Frühere Untersuchungen legen nahe, dass in Spanien und in den USA deutlich höhere Konzentrationen von Cetirizin beziehungsweise Amitriptylin auftreten, die die Ergebnisse des ELISAs potentiell negativ beeinflussen. Der Einsatz des ELISAs in diesen Ländern sollte daher mit Bedacht geschehen.

Etliche weitere in Frage kommende Kreuzreaktanden wurden nicht untersucht. Beispielsweise wurden die Metaboliten der CBZ-verwandten Arzneimittel vernachlässigt. Da die trizyklischen Arzneimittel im menschlichen Körper ähnlich wie CBZ vorwiegend am Kohlenstoffgerüst hydroxyliert werden [363], ist ähnlich wie bei CBZ eher mit einer Abnahme der Kreuzreaktivität zu rechnen.

Neben Metaboliten und Arzneimitteln kommen auch zahlreiche weitere Stoffklassen als Kreuzreaktanden in Frage. Beispielhaft wurden das Schädlingsbekämpfungsmittel DDT und

das Fungizid Fenarimol getestet, die beide sehr geringe Kreuzreaktivitäten zeigten und daher für den Einsatz des CBZ-ELISAs unproblematisch sind.

## 4.5 Quantifizierung von CBZ in Gewässern

### 4.5.1 Validierung des ELISAs

#### *Einfluss der Pipettierschritte, Plattendrift*

Der *ELISA* besteht aus einer Reihe von Arbeitsschritten, bei denen die Reagenzien manuell mit einer Pipette auf die Platte aufgetragen werden. Hinsichtlich der Messunsicherheit des ELISAs hat die Präzision der Pipette einen großen Einfluss. Die Richtigkeit des Volumens ist weniger von Belang, da Proben und Kalibrierlösungen in allen Arbeitsschritten in gleicher Weise verarbeitet werden. Zum anderen werden durch die sequenzielle Auftragung auf die Platte verschiedene Verweilzeiten in den Kavitäten verursacht, die sich in einem systematischen Fehler bemerkbar machen. Da eine längere Inkubationszeit im Allgemeinen zu einer höheren Signalstärke führt, werden bei den zuerst beladenen Kavitäten die höchsten Absorptionen gemessen. Abbildung 42 zeigt die entstehende sogenannte Assay-Drift [364] bei der sequentiellen Pipettierung durch eine Einkanal-Multipipette. Diese Drift war reproduzierbar, bei einer Umkehrung der Pipettierrichtung folgte die Assay-Drift. Diese Drift verschwand hingegen, wenn mit Hilfe der 96-Kanal-Pipettierstation Liquidator96 alle Reagenzien zeitgleich auf die Platte aufgetragen wurden.

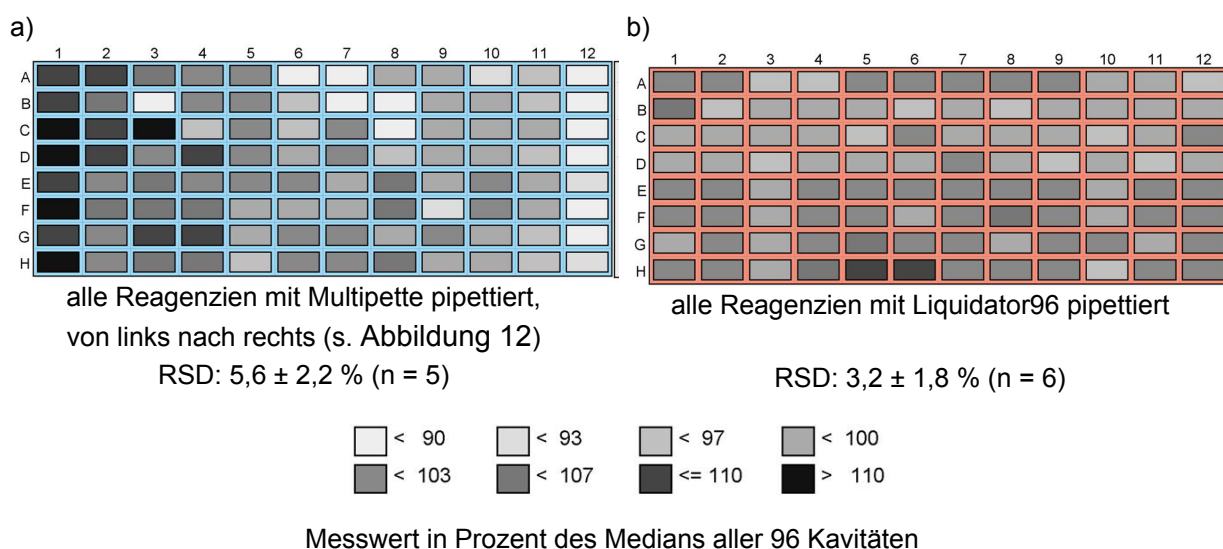


Abbildung 42: Messwerte von ELISAs bei Benutzung einer Einkanal-Multipipette (a) und der 96-Kanal-Pipettierstation Liquidator96 (b) mit Angabe der relativen Standardabweichung (Mittelwert und Standardabweichung von n Platten). Alle 96 Kavitäten wurden mit Reinstwasser statt Proben befüllt. Beispielhaft ist die Intensitätsverteilung anhand jeweils einer Platte dargestellt, die Intensität der Graustufen entspricht dabei der Höhe der Messwerte.

Die 96-Kanal-Pipettierstation bietet in der Praxis allerdings den wesentlichen Nachteil, dass alle Reagenzien vorgelegt werden müssen. Hierdurch wird zum einen das notwendige Reagenzienvolumen erhöht, zum anderen bedeutet dies beim Auftragen der Proben und

Kalibrierlösungen einen zusätzlichen Arbeitsaufwand. Nicht zuletzt steigen die Kosten durch den hohen Verbrauch an Pipettenspitzen. Die Präzision beider Pipetten war etwa identisch (s. Tabelle 23).

*Tabelle 23: Die Präzision der Pipetten Multipette Plus und Liquidator96 wurde in Abhängigkeit vom pipettierten Volumen bestimmt. Hierzu wurden alle Kavitäten von n Mikrotiterplatten mit Farbstofflösung befüllt und die OD aller 96 Kavitäten photometrisch bestimmt. Die angegebenen Werte sind die relative Standardabweichung der 96 Messwerte bzw. bei mehreren Platten der Mittelwert und die Standardabweichung hiervon. Die OD lag bei allen Experimenten zwischen 0,6 und 1,5. Zum Vergleich die Herstellerangaben der zufälligen Messabweichung: Multipette: 0,8 % bei 50 µL, Liquidator96: 0,6 % bei 200 µL.*

Volumen	Multipette Plus (Combitip 2,5 mL)	Liquidator96
25 µL	3,3 % (n = 1)	
50 µL	1,4 % (n = 1)	1,4 ± 0,1 % (n = 2)
100 µL	0,77 % (n = 1)	0,61 ± 0,03 % (n = 3)
200 µL	0,43 ± 0,02 % (n = 3)	0,46 ± 0,08 % (n = 6)

### *Präzision und Richtigkeit*

Aus den oben genannten Gründen wurde neben dem Liquidator auch auf herkömmliche Einkanal- und Mehrkanal-Pipetten zurückgegriffen, die sich besonders bei geringem Probendurchsatz als zweckmäßiger erwiesen. Die hieraus resultierende systematische Drift auf der Platte konnte durch eine gleichmäßige Verteilung der Kalibratoren und Proben teilweise kompensiert werden. Alle Proben und Standardlösungen wurden dreifach pipettiert und gleichmäßig entlang der Auftragsrichtung auf die Platte verteilt (s. Abbildung 14). Dies bot den Vorteil, dass die Replikate der Proben und der Kalibrierlösungen in vergleichbarem Maße von der Drift betroffen waren. Damit konnten die resultierenden Probenkonzentrationen mit guter Genauigkeit bei scheinbar schlechterer Präzision bestimmt werden.

Mit diesem Vorgehen konnte eine relativ geringe Varianz zwischen mehreren Experimenten (inter-assay) bei einer deutlich höheren Varianz innerhalb der Replikate eines einzigen Experiments (intra-assay) erreicht werden. Tabelle 24 zeigt, dass bei der Bestimmung der CBZ-Konzentration in 15 Oberflächenwasserproben die relative Standardabweichung zwischen mehreren Experimenten mit 3,8 % (Medianwert) nur etwa halb so hoch war wie innerhalb einer Platte. Besonders auffällig war dieser Effekt bei Probe 1, die mit 0,04 µg/L CBZ nahe der Bestimmungsgrenze lag. Die relative Standardabweichung der drei innerhalb einer Platte gemessenen Replikate betrug aufgrund der Plattendrift im Durchschnitt 25 %, während die relative Standardabweichung der auf 3 Platten bestimmten gemittelten Konzentration nur 3,8 % betrug.

Wird bei der Abschätzung der Messunsicherheit des ELISAs die Präzision der innerhalb einer Platte gewonnenen Messwerte herangezogen, ergeben sich dabei demnach viel höhere Unsicherheiten als tatsächlich vorhanden. Ein großer Teil der gemessenen Streuung beruht auf dem durch die Plattendrift verursachten systematischen Fehler, der durch die geeignete Verteilung von Proben und Kalibratoren weitgehend kompensiert wird. Eine realistischere Bestimmung der Messunsicherheit ist allerdings schwierig, da sich die Beiträge von Plattendrift und zufälliger Varianz nicht auf einer einzigen Platte separieren

lassen. Durch wiederholte Messungen auf mehreren Platten ließe sich die Messunsicherheit des ELISAs zuverlässiger bestimmen, was aber nicht praxisgerecht wäre.

*Tabelle 24: In 15 Oberflächenwasserproben wurde an drei verschiedenen Tagen der CBZ-Gehalt bestimmt. Jede Probe wurde an allen drei Tagen in je drei Replikaten gemessen. Dargestellt sind die mittlere Konzentration der Probe, die relative Standardabweichung (RSD) der an den drei verschiedenen Tagen ermittelten mittleren CBZ-Konzentrationen (inter-assay), sowie die gemittelte relative Standardabweichung der drei an einem Tag gemessenen Replikate (intra-assay). Durchführung des ELISAs bei pH 10,5 nach Pipettierschema B.*

	Wiederholbarkeit		C <sub>CBZ</sub> [µg/L]	
	Inter-assay (n = 3)	Intra-assay (n = 3)	ELISA	LC-MS/MS
	RSD	RSD*		
Probe 1	3,8 %	25 %	0,040	0,036
Probe 2	1,6 %	8,9 %	2,04	1,98
Probe 3	3,8 %	7,9 %	1,56	1,50
Probe 4	0,1 %	6,3 %	1,13	1,09
Probe 5	3,3 %	9,3 %	0,94	0,94
Probe 6	4,1 %	7,0 %	0,15	0,14
Probe 7	4,7 %	6,5 %	1,76	1,69
Probe 8	4,1 %	7,5 %	1,12	1,09
Probe 9	2,6 %	6,7 %	0,98	0,93
Probe 10	7,3 %	7,6 %	1,0	0,96
Probe 11	6,8 %	6,8 %	0,36	0,34
Probe 12	1,2 %	3,4 %	0,24	0,24
Probe 13	5,2 %	5,3 %	0,43	0,41
Probe 14	1,2 %	6,0 %	0,20	0,19
Probe 15	1,4 %	9,4 %	0,16	0,16
Median	3,8 %	7,0 %		

Um die Richtigkeit des CBZ-ELISAs zu beurteilen, wurden zahlreiche Wasserproben mit dem ELISA und der als Referenz dienenden HPLC-MS/MS-Technik untersucht. Abbildung 43a zeigt, dass für Oberflächenwasser, Klärwerksablauf und Klärwerkszulauf gleichermaßen eine hohe Korrelation zwischen beiden Methoden gefunden wurde ( $R^2 = 0,978$ ). Aus der Steigung der Regressionsgeraden lässt sich entnehmen, dass mit dem ELISA die CBZ-Konzentration um etwa 7 % höher lag als mit der Referenzmethode. Der bedeutsamste Kreuzreaktant ist EP-CBZ, das eine pH-unabhängige Kreuzreaktivität von ca. 70 % zeigt. Die Konzentrationen dieses Metaboliten in Wasserproben betragen laut früheren Untersuchungen etwa 7-13 % der Konzentration von CBZ (s. Tabelle 6), in eigenen Messungen wurden Werte zwischen 4 und 7 % gefunden (s. Tabelle 30). Pharmakologische Untersuchungen lassen auf einen Anteil von 4-10 % in den menschlichen Ausscheidungen schließen (s. Tabelle 1). Somit lässt sich die Überbestimmung von 7 % fast vollständig mit der Präsenz von EP-CBZ erklären.

Abbildung 43b zeigt den Einfluss des pH-Wertes auf die Genauigkeit des CBZ-ELISAs. Bei pH 4,5 tragen neben CBZ die Kreuzreaktanden, darunter hauptsächlich Cetirizin, EP-CBZ und 2-OH-CBZ, zur ELISA-Konzentration bei. Bei pH 10,5 hingegen ist die Kreuzreaktivität

von Cetirizin und 2-OH-CBZ minimal. Bei der Messung von Proben aus Abwasser und Oberflächenwasser sank der Median der Überbestimmung von 139 % bei pH 4,5 auf 122 % bei pH 7,6, 113 % bei pH 9,5 und 106 % bei pH 10,5.

Die Durchführung des ELISAs bei pH 10,5 führte gleichzeitig zu einem niedrigeren Messsignal sowie einer etwa 50 % höheren Nachweisgrenze (s. Kapitel 4.4.3). Die niedrigere Sensitivität wurde zugunsten der höheren Richtigkeit in Kauf genommen. Für die Analyse von Abwasser und Oberflächengewässern ist dieser Sensitivitätsverlust in den meisten Fällen unkritisch, da immer noch eine sehr niedrige Bestimmungsgrenze erreicht wurde. Bei Bedarf kann der Test bei pH 9,5 ohne Einbußen bei Signal und Testmittelpunkt bei immer noch akzeptabler Richtigkeit durchgeführt werden.

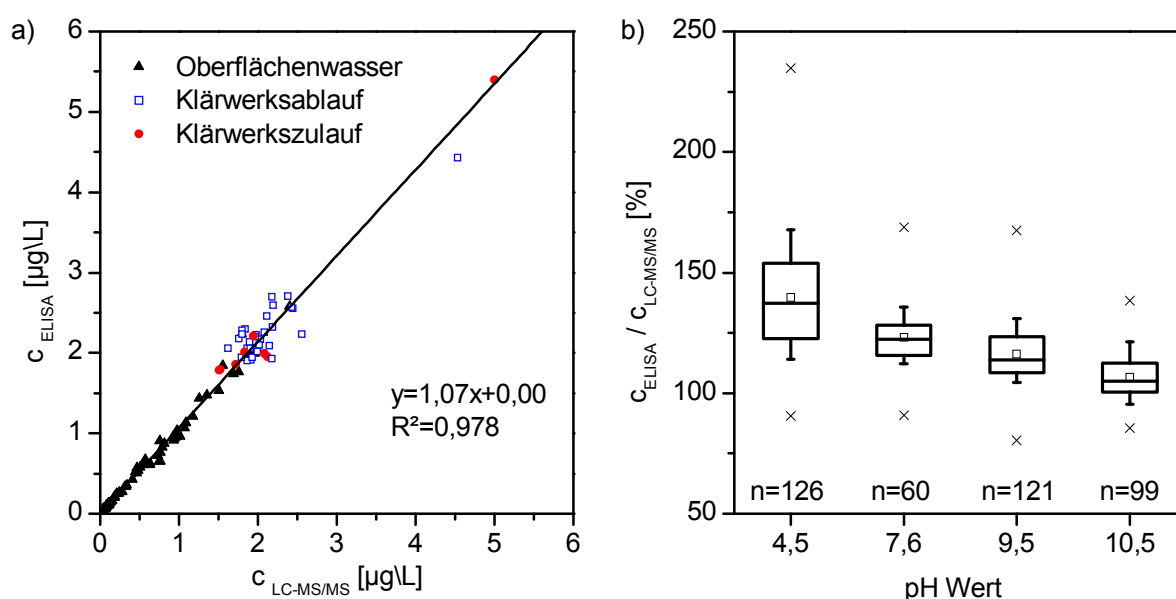


Abbildung 43: a) Die CBZ-Konzentration in Proben aus Oberflächengewässern und Klärwerken (Zu- und Ablauf) wurde mit ELISA (Methode B, pH 10,5) und LC-MS/MS bestimmt. Der Graph zeigt die Korrelation beider Methoden sowie die errechnete Regressionsgerade. b) Proben aus Oberflächenwasser und Abwasser wurden mit dem ELISA unter Verwendung von vier verschiedenen Probenpuffern bei pH 4,5, bei pH 7,6 mit 1 % BSA, bei pH 9,5 und bei pH 10,5 gemessen. Die gemessene CBZ-Konzentration wurde ins Verhältnis zum Ergebnisse von LC-MS/MS gesetzt (n Proben). Die Kästen beschreiben den Wertebereich von 10-90 %, der Querbalken den Median, das Quadrat den Mittelwert und die Kreuze die Extremwerte.

### Bestimmung der Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde das Präzisionsprofil benutzt, das die Abhängigkeit zwischen der Präzision eines Messwertes und dem Messwert selbst darstellt (s. Abbildung 44). Bei pH 10,5 unter Verwendung von Pipettierschema B lagen die Nachweisgrenzen in dem gezeigten Beispiel bei 0,011  $\mu g/L$  bzw. 8,3  $\mu g/L$  und die Bestimmungsgrenzen bei 0,034  $\mu g/L$  bzw. 2,7  $\mu g/L$ . Diese Bestimmungsgrenzen sind für die Quantifizierung von CBZ in Abwasser und Oberflächengewässern in den meisten Fällen ausreichend.

Es ist bemerkenswert, dass die Nachweisgrenzen unter den beschriebenen Bedingungen (Probenpuffer bei pH 10,5 ohne BSA, Pipettierschema B) bei 0,01 bzw. 8  $\mu g/L$  lagen, bei den zu Beginn der Arbeit benutzten Bedingungen (Probenpuffer bei pH 7,6 mit BSA,

Pipettierschema A) hingegen bei 0,05 bzw 50 µg/L [280]. Die Absenkung der unteren Nachweisgrenze lässt sich durch die geringere Plattendrift und die damit geringere Varianz der Messwerte erklären. Die gleichfalls absinkende obere Nachweisgrenze ist hiermit hingegen nicht erklärbar. Es ist denkbar, dass die Verminderung der unspezifischen Adsorption von Tracer an die Plattenoberfläche durch den BSA-Zusatz bei pH 7,6 hierfür verantwortlich war. Bei hohen Analytkonzentrationen bindet nur eine sehr kleine Menge Tracer an den Antikörper, so dass der Anteil unspezifisch gebundener Peroxidase potentiell einen großen Einfluss auf das Hintergrundsignal hat. Nach den in Kapitel 0 getroffenen Überlegungen hat der hierdurch beeinflusste Sockelfehlerbeitrag entscheidenden Einfluss auf die obere Bestimmungsgrenze.

Für die Bestimmung von sehr hohen CBZ-Konzentrationen kann demnach ein BSA-Zusatz im Probenpuffer oder ein Blocken der Platte in einem eigenen Arbeitsschritt von Vorteil sein. Hierzu wurden aus Zeitgründen keine weitergehenden Experimente durchgeführt.

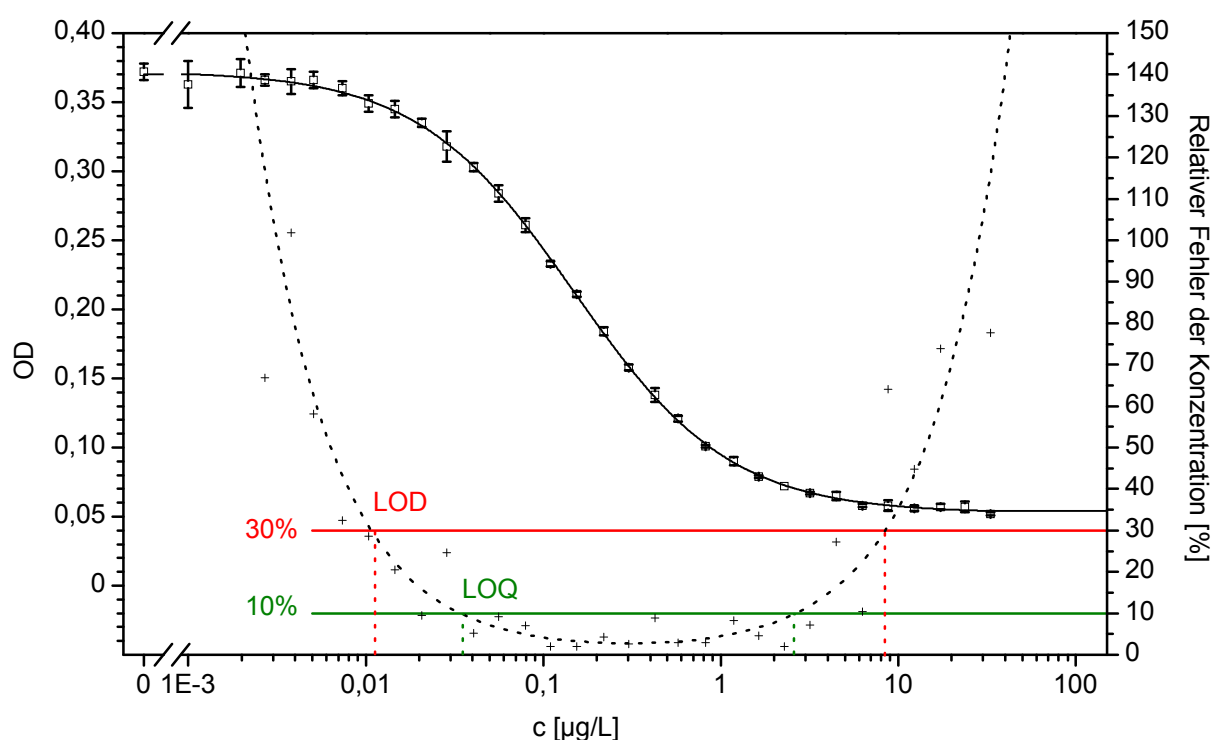


Abbildung 44: Kalibrierkurve mit Präzisionsprofil (gepunktete Linie) des CBZ ELISAs (Methode B, pH 10,5, Pipettierschema B, Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Replikaten).

#### Weitere Einflussfaktoren

Die Messunsicherheit des Photometers und die Auswirkungen der Fertigungstoleranzen der Mikrotiterplatte wurden nicht gesondert untersucht. Der Hersteller gibt bei der angestrebten OD von 1 eine zufällige Messunsicherheit von weniger als 0,3 % an, unterhalb einer OD von 0,3 wird noch eine Unsicherheit von weniger als 1 % garantiert.

Die Benutzung der Referenzwellenlänge von 650 nm bei der photometrischen Messung kann Verunreinigungen der Plattenoberfläche, Kratzer, Schwebstoffe in der Lösung o.ä. teilweise kompensieren. Diese Einflüsse verursachen eine Streuung des Lichtes, die für die



zu messende Wellenlänge und die Referenzwellenlänge annähernd identisch sind. Somit ist eine Kompensation möglich.

#### 4.5.2 Quantifizierung von Cetirizin und CBZ mit einem Dual-Analyt-Immunoassay

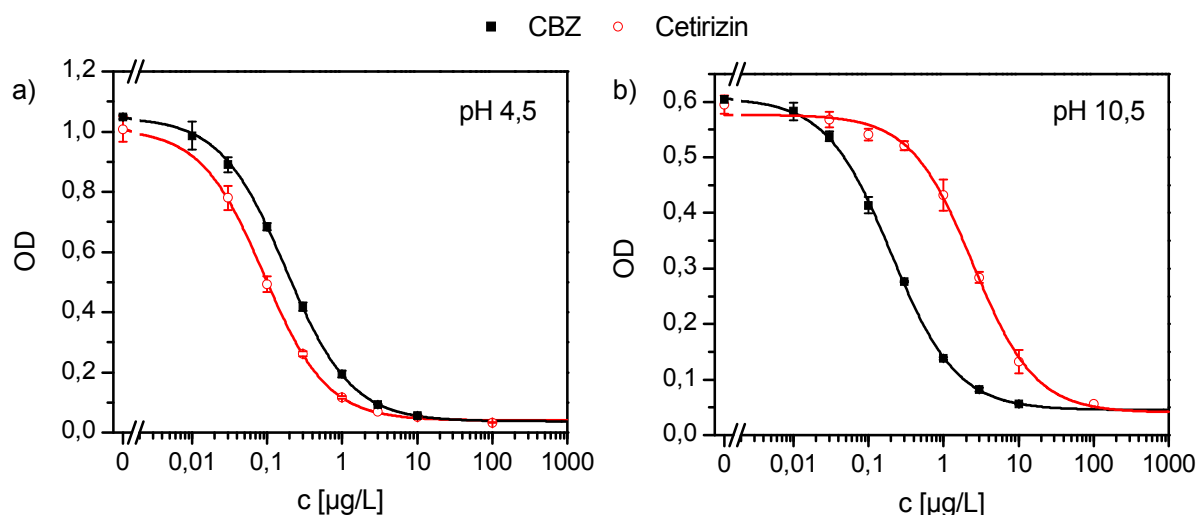


Abbildung 45: Kalibrierkurven von CBZ und Cetirizin bei pH 4,5 (a) und pH 10,5 (b). Mittelwert und Standardabweichung ( $n = 2$ ). Errechnete Parameter der Kalibrierfunktion: a) CBZ:  $A = 1,05$ ;  $B = 0,964$ ;  $C = 0,180$ ;  $D = 0,034$ ; Cetirizin:  $A = 1,01$ ;  $B = 1,03$ ;  $C = 0,091$ ;  $D = 0,041$ ; b) CBZ:  $A = 0,607$ ;  $B = 0,998$ ;  $C = 0,202$ ;  $D = 0,045$ ; Cetirizin:  $A = 0,576$ ;  $B = 1,05$ ;  $C = 2,46$ ;  $D = 0,041$ .

Abbildung 45 zeigt die Kalibrierkurven von CBZ und Cetirizin bei den pH-Werten 4,5 und 10,5. Deutlich erkennbar ist, dass die Kreuzreaktivität von Cetirizin bei pH 4,5 wesentlich geringer ist als bei pH 10,5. Diese pH-abhängige Kreuzreaktivität eröffnet die Möglichkeit, mit dem vorgestellten ELISA neben CBZ ebenfalls Cetirizin zu quantifizieren. Damit dies zuverlässig funktionieren kann, muss folgende Randbedingung gelten:

$$c_{\text{ELISA}} = c_{\text{CBZ}} + c_{\text{Cetirizin}} \cdot \text{CR}_{\text{Cetirizin}} \quad (18)$$

oder allgemeiner formuliert:

$$c_{\text{ELISA}} = c_{\text{CBZ}} + \sum_i c_i \cdot \text{CR}_i \quad (19)$$

$c_{\text{ELISA}}$  ist die mit dem ELISA bestimmte Konzentration, die mit Hilfe einer CBZ-Kalibrierkurve bestimmt wurde (Äquivalentkonzentration).  $c_{\text{CBZ}}$  und  $c_i$  bezeichnen die Konzentrationen von CBZ bzw. dem Kreuzreaktanden  $i$  und  $\text{CR}_i$  dessen Kreuzreaktivität.

Anschaulich formuliert bedeutet dies, dass ein Molekül mit 10-fach höherer Kreuzreaktivität als CBZ dasselbe ELISA-Signal verursacht wie CBZ in 10-fach höherer Konzentration. Dies ist dann erfüllt, wenn die Kalibrierkurven beider Substanzen über den gesamten Messbereich parallel verlaufen. Bei dieser Randbedingung handelt es sich um ein Postulat



und es ist insbesondere unklar, ob diese Bedingung über den gesamten Konzentrationsbereich erfüllt ist.

Abbildung 46 zeigt daher das Verhältnis  $c_{\text{ELISA}}/c_{\text{Cetirizin}}$  bei verschiedenen Cetirizin-Konzentrationen in Abwesenheit von CBZ. Bei beiden untersuchten pH-Werten war dieses Verhältnis für den quasilinearen Bereich im Zentrum der Kalibrierkurve annähernd konstant. Für Konzentrationen, die im asymptotischen Bereich der Kalibrierkurve lagen, wich das Verhältnis  $c_{\text{ELISA}}/c_{\text{Cetirizin}}$  erheblich davon ab, was hauptsächlich auf die dort geringere Genauigkeit zurückzuführen ist.

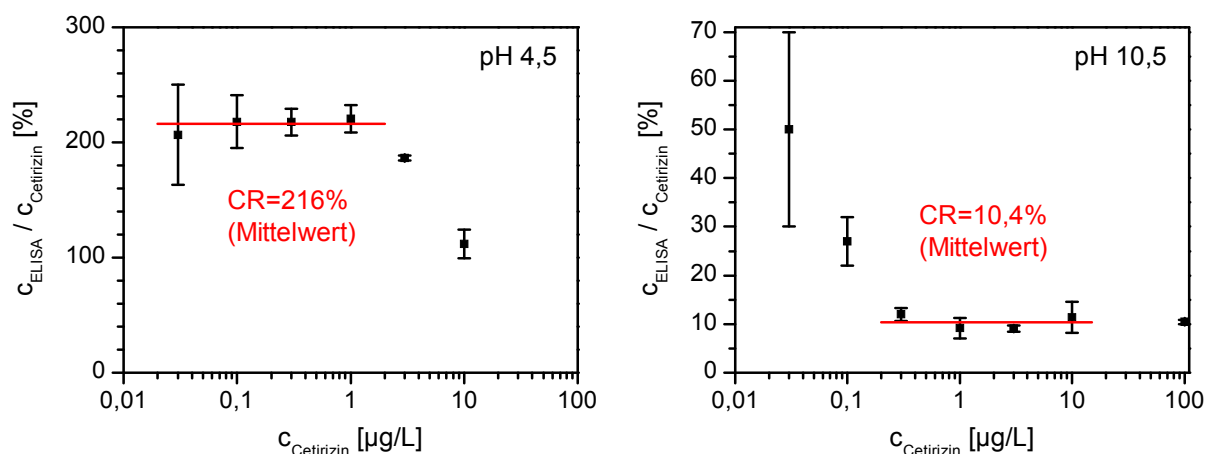


Abbildung 46: Die Äquivalentkonzentrationen  $c_{\text{ELISA}}$  der Cetirizin-Kalibrierlösungen aus Abbildung 45 wurden mit Hilfe der CBZ-Kalibrierkurve berechnet. Das Verhältnis  $c_{\text{ELISA}}/c_{\text{Cetirizin}}$  wurde gegen die Cetirizin-Konzentration aufgetragen. Die Kreuzreaktivität (CR) ergibt sich als mittleres Verhältnis  $c_{\text{ELISA}}/c_{\text{Cetirizin}}$  derjenigen Punkte, die sich innerhalb des Quantifizierungsbereichs der CBZ-Kalibrierkurve befinden.

Aus Gleichung (19) ergibt sich die Möglichkeit, mit Hilfe von zwei ELISA-Messungen bei den pH-Werten 4,5 und 10,5 und nach der Lösung eines linearen Gleichungssystems den Cetirizin-Gehalt in der Probe zu bestimmen (s. Kapitel 3.6.1). Ein ähnlicher Ansatz wurde für die Bestimmung zweier Atrazin-Derivate mit Hilfe von zwei verschiedenen Antikörpern mit unterschiedlichen Kreuzreaktivitäten vorgeschlagen [365].

### Validierung

Um dieses Verfahren zu validieren, wurde eine Wasserprobe aus dem Wannsee mit CBZ, Cetirizin oder mit beiden Analyten zugleich dotiert, wobei je fünf verschiedene Konzentrationen zwischen 0,05 und 1,2  $\mu\text{g/L}$  verwendet wurden. Die Äquivalentkonzentrationen der Proben sowie die Kreuzreaktivität von Cetirizin wurden mit dem ELISA bei pH 4,5 und 10,5 gemessen. Hieraus wurden die Konzentrationen von CBZ und Cetirizin wie beschrieben errechnet. Hohe Wiederfindungsraten zwischen 98 % und 107 % für CBZ sowie zwischen 87 % und 111 % für Cetirizin belegen die Eignung dieser Methode (s. Tabelle 25). Somit ist davon auszugehen, dass Gleichung (18) im relevanten Konzentrationsbereich auch dann gilt, wenn beide Analyten gleichzeitig vorliegen.

Es ist anzumerken, dass die Kreuzreaktivität nach der in Abbildung 46 gezeigten Methode wesentlich genauer und robuster bestimmt werden konnte als über das Verhältnis der Testmittelpunkte. Nach dem klassischen Verfahren hätten sich im vorliegenden Beispiel

Kreuzreaktivitäten von 254 % statt 298 % bei pH 4,5 und 15,1 % statt 13,5 % bei pH 10,5 ergeben. Obschon in der Größenordnung vergleichbar, hätten diese Kreuzreaktivitäten zu erheblich schlechteren Wiederfindungsraten geführt als in Tabelle 25 dargestellt. Aus diesem Grund wurden bei der Quantifizierung von Cetirizin die Kreuzreaktivitäten auf die in Abbildung 46 gezeigte Weise bestimmt. Um tagesabhängige Schwankungen zu berücksichtigen, geschah diese Bestimmung bei jedem Experiment.

*Tabelle 25: Eine Wasserprobe aus dem Wannsee wurde mit CBZ und Cetirizin dotiert. Die CBZ-Äquivalentkonzentration ( $c_{ELISA}$ ) bei pH 4,5 und 10,5 wurde gemessen (n Replikate, Mittelwert und Standardabweichung sind angegeben). Die gemessenen molaren Kreuzreaktivitäten von 298 % (pH 4,5) und 13,5 % (pH 10,5) wurden benutzt, um die Konzentrationen von CBZ und Cetirizin zu extrapolieren. Hieraus wurde die Wiederfindungsrate der zugefügten Konzentrationen bestimmt.*

Dotierte Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]		gemessene ELISA-Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]; n = 3		Extrapolierte Konzentration [ $\mu\text{g/L}$ ]		WFR [%]	
CBZ	Cetirizin	pH 4,5	pH 10,5	CBZ	Cetirizin	CBZ	Cetirizin
-	-	$0,41 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,04$	0,29	0,041	-	-
0,059	-	$0,44 \pm 0,07$	$0,34 \pm 0,02$	0,34	0,032	98	-
0,118	-	$0,54 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,04$	0,40	0,048	99	-
0,297	-	$0,72 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,05$	0,63	0,032	107	-
0,593	-	$1,05 \pm 0,03$	$0,912 \pm 0,007$	0,90	0,049	103	-
1,180	-	$1,7 \pm 0,1$	$1,46 \pm 0,04$	1,4	0,071	99	-
-	0,054	$0,57 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,02$	0,29	0,095	-	100
-	0,108	$0,7 \pm 0,1$	$0,32 \pm 0,03$	0,30	0,14	-	95
-	0,272	$1,1 \pm 0,2$	$0,35 \pm 0,06$	0,31	0,28	-	89
-	0,543	$2,0 \pm 0,2$	$0,38 \pm 0,03$	0,30	0,56	-	96
-	1,080	$4,0 \pm 0,4$	$0,43 \pm 0,01$	0,26	1,2	-	111
0,059	0,054	$0,64 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,03$	0,35	0,10	101	104
0,118	0,108	$0,79 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$	0,41	0,13	101	87
0,297	0,272	$1,45 \pm 0,02$	$0,647 \pm 0,005$	0,61	0,28	104	90
0,593	0,543	$2,6 \pm 0,2$	$0,97 \pm 0,06$	0,90	0,58	102	99
1,180	1,080	$5,0 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,2$	1,4	1,2	98	106

Der vorgeschlagene Ansatz kann nur dann zuverlässig funktionieren, wenn der Beitrag weiterer Reaktanden mit pH-abhängiger Kreuzreaktivität vernachlässigbar ist. Für die Metaboliten dürfte dies in den meisten Fällen zutreffen, da sowohl deren Kreuzreaktivität als auch Konzentration relativ niedrig waren. Die in Frage kommenden Arzneimittel mit pH-abhängiger Kreuzreaktivität sind in Deutschland entweder nur in geringen Mengen oder gar nicht gefunden worden (s. Kapitel 4.4.5), so dass diese Stoffe hier mit guter Erfolgsaussicht vernachlässigt werden können. In den USA und in Wales hingegen dürfte sich die hohe Amitriptylin-Konzentration in Höhe von mehreren  $\mu\text{g/L}$  in Abwässern erschwerend auswirken. Mit 11 % ist die molare Kreuzreaktivität von Amitriptylin zwar ca. 40-fach geringer als diejenige von Cetirizin, trotzdem kann sich bei diesen hohen Konzentrationen ein erheblicher Fehler ergeben. In Spanien wurden Imipramin und Amitriptylin im zwei- bis

dreistelligen ng/L- Bereich gefunden, so dass auch dort Vorsicht geboten ist. In allen Fällen besteht insbesondere die Gefahr falsch positiver Befunde.

Weiterhin kann die Enantioselektivität des Antikörpers zu Problemen bei der Quantifizierung von Cetirizin führen. In Deutschland ist dieses Problem wahrscheinlich nur schwach ausgeprägt, da das enantiomerenreine Präparat Levocetirizin hierzulande nur nach ärztlicher Verschreibung erhältlich ist und daher deutlich seltener eingesetzt werden dürfte als das frei erhältliche Racemat. Beim Einsatz in Ländern mit höherem Marktanteil von Levocetirizin besteht hingegen die Gefahr, dass der Cetirizin-ELISA die Gesamtkonzentration beider Enantiomere aufgrund der geringeren Kreuzreaktivität von Levocetirizin unterbewertet.

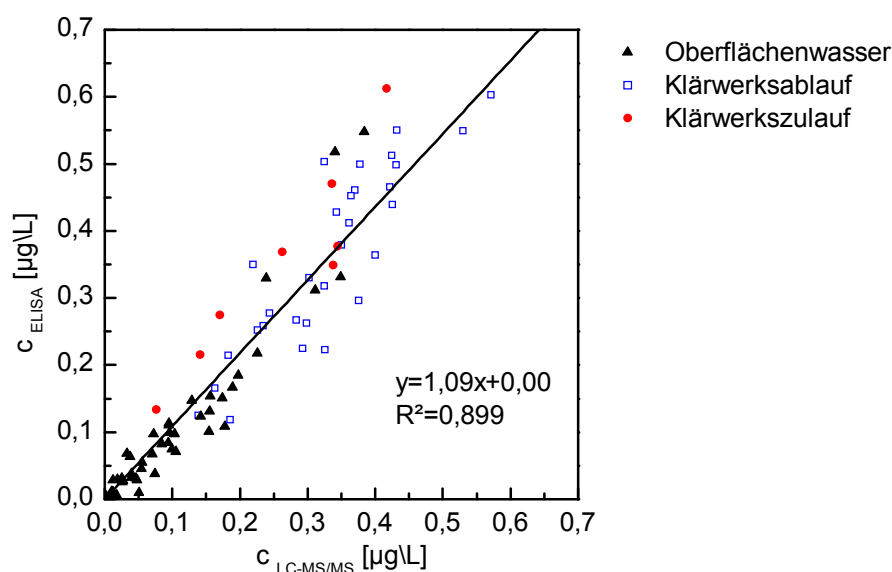


Abbildung 47: Die Cetirizin-Konzentration in 85 Proben aus Oberflächengewässern und Klärwerken (Zu- und Ablauf) wurde mit ELISA und LC-MS/MS bestimmt. Der Graph zeigt die Korrelation beider Methoden sowie die errechnete Regressionsgerade.

Um die Eignung der Methode zu überprüfen, wurde der Cetirizin-Gehalt von 85 Proben aus Oberflächengewässern und Abwässern mit dem ELISA bestimmt und mit der Referenzmethode LC-MS/MS verglichen. Für beide Methoden wurde ein hohes Maß an Korrelation gefunden ( $R^2 = 0,899$ , s. Abbildung 47). Die Streuung der Messergebnisse war sichtlich höher als bei der Analyse von CBZ (s. Abbildung 43a). Dies ist zum einen auf die Fehlerfortpflanzung zurückzuführen, die bei der Kombination zweier unabhängiger Messergebnisse entsteht. Zum anderen wurde die Präzision der Cetirizin-Messung von der wesentlich höheren Menge an CBZ in den Proben negativ beeinflusst. Dies wird aus Gleichung (12) ersichtlich: Die Fehler bei der Differenzbildung aus den Äquivalentkonzentrationen bei pH 4,5 und pH 10,5 ist umso größer, je größer die Konzentrationen selbst sind.

Wie aus der Steigung der Regressionsgeraden ersichtlich, zeigte der ELISA darüber hinaus eine systematische Überbestimmung von ca. 9 %. Dies lässt sich auf die Präsenz weiterer Kreuzreaktanden wie zum Beispiel 2-OH-CBZ zurückführen, die zur Vereinfachung vernachlässigt wurden. In diesem Kontext muss auch die höhere Überbestimmung bei Proben aus dem Klärwerkszulauf betrachtet werden. Es ist denkbar, dass hierfür Stoffe

verantwortlich sind, die wie Cetirizin eine pH-abhängige Kreuzreaktivität zeigen (s. Kapitel 4.4.1) und die bei der Klärwerkspassage abgebaut werden.

Trotz dieser konzeptionellen Mängel kann der erreichte Grad an Korrelation zwischen ELISA und LC-MS/MS als akzeptabel bezeichnet werden.

## 4.6 Referenzanalytik: LC-MS/MS

Zur Quantifizierung von organischen Spurenstoffen hat sich LC-MS/MS etabliert. Insbesondere für den Nachweis von CBZ sind zahlreiche Verfahren publiziert worden [174, 221]. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode wurde nicht bis ins Detail auf hohe Empfindlichkeit optimiert, sondern nur insoweit, dass eine Überprüfung der ELISA-Ergebnisse zufriedenstellend möglich war. Die meisten gerätespezifischen Parameter des Massenspektrometers wurden nicht systematisch optimiert, sondern es wurden Erfahrungswerte verwendet. Auf diese Weise ließ sich in vergleichsweise kurzer Zeit eine Methode entwickeln, die als Referenz für die mit dem Immunoassay erhaltenen Ergebnisse herangezogen werden konnte.

Im Laufe des Projektfortschrittes wurden zwei verschiedene Methoden erarbeitet. Zu Beginn wurde eine Methode entwickelt, die nur für die Quantifizierung des eigentlichen Zielanalyten CBZ geeignet war. Die später entworfene Methode war auch für die Quantifizierung vieler CBZ-Metaboliten sowie Cetirizin geeignet. Im Wesentlichen unterschieden sich die beiden Methoden in der Wahl der chromatographischen Bedingungen, die für eine saubere Trennung der Analyten erforderlich waren.

### 4.6.1 Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Die Quantifizierung von CBZ, Cetirizin und den CBZ-Metaboliten erforderte eine sorgfältige chromatographische Trennung. Unter den CBZ-Metaboliten befanden sich einige Konstitutionsisomere, die im Massenspektrometer einen sehr ähnlichen Zerfall zeigten und daher mit diesem nicht hinreichend unterschieden werden konnten. Abbildung 48 zeigt die chromatographische Trennung bei Verwendung verschiedener Säulen und Laufmittel. Mindestens sieben Substanzen zeigten den Massenübergang  $m/z$  253→210. Die beste Trennung gelang mit der monomeren C18-Säule Phen1, die vom Hersteller für die Analyse von phenolischen Substanzen beworben wird. Mit einem Wasser-Methanol Gradienten konnten fünf Analyten zufriedenstellend getrennt werden, die beiden übrigen (II und III) lagen sehr nah beieinander. Dieser Doppelpeak wurde aus Zeitgründen nicht weiter getrennt.

Der Vergleich mit den Methoden c und d zeigt anschaulich die hohen Anforderungen an die analytische Methode. Bei Verwendung ungeeigneter Bedingungen können nicht alle Isomere chromatographisch getrennt werden. Dies mag der Grund sein, weshalb in keiner einzigen auf chromatographischen Techniken aufbauenden Untersuchung der letzten 20 Jahre die Substanz 1-OH-CBZ nachgewiesen werden konnte. 1-OH-CBZ ist einer der Hauptmetaboliten von CBZ und wurde mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse identifiziert.

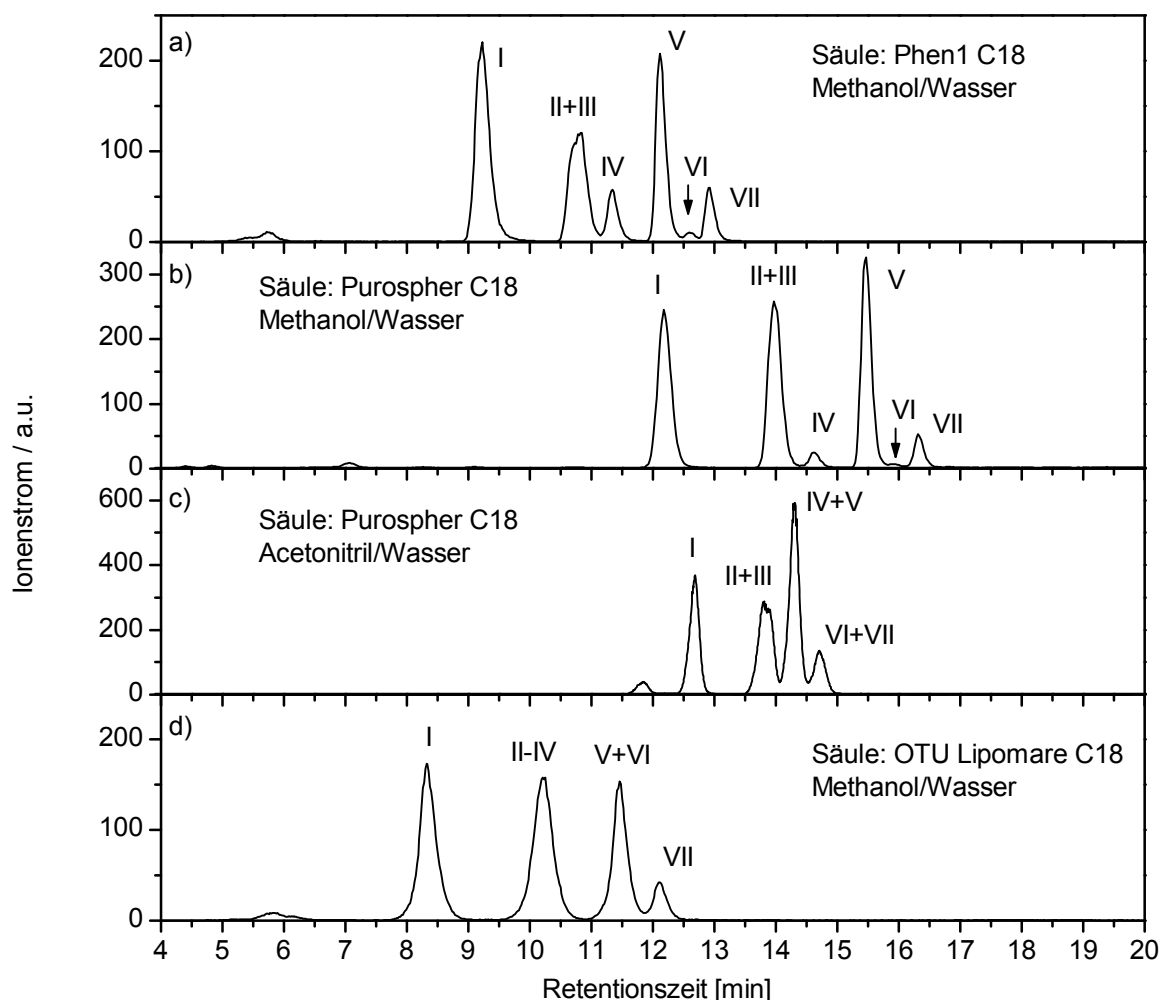


Abbildung 48: Vergleich der chromatographischen Trennungen einer Probe aus dem Klärwerksablauf von Klärwerk Waßmannsdorf mit vier verschiedenen Kombinationen aus Säule und Laufmittel. Messung des Massenübergangs (MRM) 253→210 mit LC-MS/MS. Substanzzuordnung: I DiOH-CBZ, II 2-OH-CBZ, III unbekannt, IV EP-CBZ, V 3-OH-CBZ, VI Ox-CBZ, VII „X-OH-CBZ“

#### 4.6.2 Validierung der Referenzmethode

Die gemessene Peakfläche sollte unter idealen Bedingungen direkt proportional zur vorliegenden Analytkonzentration sein. In diesem Fall ergibt die Auftragung des Responsefaktors (Quotient aus Peakfläche und Konzentration) gegen die Konzentration eine Gerade mit der Steigung Null. Abbildung 49 zeigt, dass bei Konzentrationen unterhalb von 10 µg/L dieser ideale Verlauf für alle Analyten annähernd eingehalten wurde. Oberhalb dieses Wertes verlor die Ionisierung durch die einsetzende Sättigung an Effizienz und der Responsefaktor wurde allmählich geringer. Dieses Phänomen war substanzabhängig und für 2-OH-CBZ und CBZ am größten und für Cetirizin, DiOH-CBZ und Ox-CBZ schwach oder gar nicht ausgeprägt.

Bis zu einer Konzentration von 10 µg/L wurde daher mit einer linearen Funktion kalibriert, für den Konzentrationsbereich bis 100 µg/L war eine quadratische Funktion besser geeignet. Besondere Beachtung erforderte der interne Standard  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -CBZ, der zur Kompensation von Ionensuppressionen und geräteabhängigen Schwankungen eingesetzt wurde.

Dieser Standard wurde sowohl zur Korrektur von CBZ selbst als auch der CBZ-Metaboliten eingesetzt, für die kein eigener isotoopenmarkierter Standard erhältlich war. Für CBZ funktionierte diese Korrektur zufriedenstellend und die eingangs erwähnte konzentrationsabhängige Ionensuppression wird zumindest teilweise durch die Berücksichtigung des internen Standards kompensiert. Da der interne Standard exakt zur selben Zeit eluiert wird wie CBZ, bedeutet dies umgekehrt, dass der interne Standard für die Korrektur der CBZ-Metaboliten nur dann zuverlässig wirken kann, wenn die CBZ-Konzentration in der Probe unterhalb von 100 µg/L liegt. Die höchsten Probenkonzentrationen sind in Abwässern zu erwarten, in denen in Deutschland gewöhnlich Werte von 1-5 µg/L CBZ auftreten, so dass bei einer Direktanalyse ohne Probenkonzentrierung diesbezüglich keine Probleme zu erwarten sind. Anders sieht es aus, wenn eine SPE-Probenvorbereitung eingesetzt werden soll. Aus diesem Grund wurden die untersuchten Oberflächen- und Abwasserproben vergleichsweise gering angereichert (20- bis 50-fach).

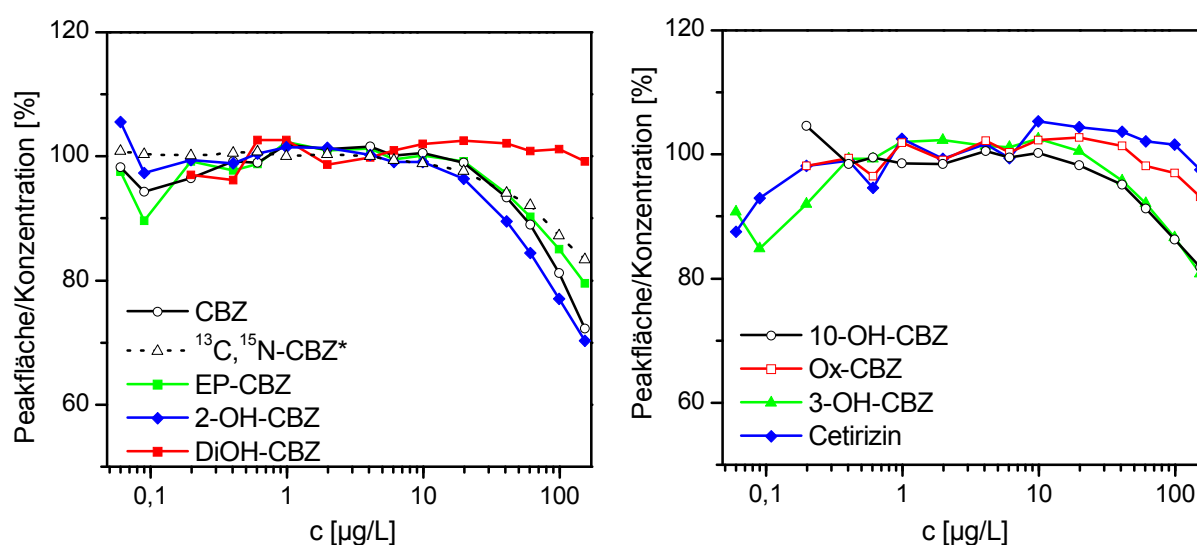


Abbildung 49: Die Abhängigkeit des Responsefaktors von der Konzentration ist dargestellt (Mittelwert aus zwei Messungen). Die Korrektur durch den internen Standard ist hier nicht berücksichtigt.

\*Für  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -CBZ wurde statt des Responsefaktors die Peakfläche gegen die CBZ-Konzentration aufgetragen.

#### Wiederfindungsrate nach Dotierung

Um die Eignung der Methode für die Analyse von Leitungswasser, Oberflächenwasser sowie geklärtem und ungeklärtem Abwasser zu untersuchen, wurde je eine Probe aus allen Matrices mit den Analyten dotiert und die Wiederfindungsrate bei zwei verschiedenen Konzentrationsniveaus bestimmt. In den meisten Fällen wurden sowohl eine Analyse nach Festphasenanreicherung als auch eine Analyse ohne Anreicherung durchgeführt. Ausnahmen bildeten Leitungswasser und ungeklärtes Abwasser, die erst gegen Ende der Arbeit in größerem Umfang beprobt wurden und aus Zeitgründen nur nach Direkteinspritzung gemessen wurden.

Die Wiederfindungsrate von Cetirizin wurde ohne Benutzung eines internen Standards errechnet, für alle übrigen Analyten wurde  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -CBZ benutzt. Gegen Ende der Arbeit war auch der isotoopenmarkierte Standard Cetirizin- $\text{d}_8$  verfügbar, der nur noch für die Analyse nach direkter Injektion zum Einsatz kam.

Nach vorhergehender Festphasenanreicherung wurden für alle Analyten und alle Matrices ausreichend hohe Wiederfindungsraten erreicht (s. Tabelle 26). Bei einer Dotierung mit 1 µg/L lagen die Wiederfindungsraten zwischen 79 und 122 %, bei einer Dotierung mit 0,1 µg/L zwischen 66 und 129 %. Die höhere Schwankungsbreite bei dem niedrigeren Dotierungsniveau ist auf den naturgemäß größeren Fehler bei der Bildung kleiner Differenzen von vergleichsweise hohen Konzentrationen zurückzuführen.

Bei direkter Injektion von Oberflächenwasser ohne Anreicherung wurden für alle Analyten zufriedenstellende Wiederfindungsraten zwischen 72 und 114 % erreicht. Bei geklärtem und besonders bei ungeklärtem Abwasser wurden hingegen nur für CBZ und Cetirizin sehr gute Wiederfindungsraten um 100 % gefunden. Für die Metaboliten lagen die Werte in den meisten Fällen zwischen 60 und 80 % und damit immer noch in einem akzeptablen Bereich. Die niedrigste WFR wurde mit 46 % bei der Quantifizierung von 2-OH-CBZ in ungeklärtem Abwasser gefunden. Eine genauere Untersuchung der Responsefaktoren nach Dotierung ergab, dass besonders bei den Proben aus Abwässern erhebliche Ionisationssuppressionen auftraten, die für die niedrigen Wiederfindungsraten verantwortlich sind (Daten nicht gezeigt). Die Kompensation dieses Matrixeffekts durch den internen Surrogatstandard <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-CBZ gelang dabei offenbar nur unvollständig.

Tabelle 26: Relative Wiederfindungsraten in verschiedenen Wasserarten nach Dotierung. Eine Probe wurde mit je zwei Analytkonzentrationen dotiert. Die Werte in Klammern bezeichnen relative Standardabweichungen in Prozent aus zwei Messungen. Leitungswasser wurde ausschließlich mit CBZ dotiert (n.b.: nicht bestimmt).

Relative Wiederfindungsrate [%]	Dotierung [µg/L]	CBZ	DIOH-CBZ	2-OH-CBZ	10-OH-CBZ	EP-CBZ	3-OH-CBZ	Ox-CBZ	Cetirizin
<i>nach SPE (50x)</i>									
Reinstwasser	0,1	98(1)	101(1)	100(8)	102(1)	102(4)	100(7)	<LOD	82(3)*
	1,0	96(1)	98(1)	97(2)	98(1)	100(2)	97(4)	<LOD	79(1)*
Oberfl.wasser	0,1	83(25)	116(55)	99(15)	129(9)	111(5)	123(17)	<LOD	79(6)*
	1,0	99(2)	97(4)	100(1)	110(1)	108(1)	122(4)	<LOD	84(5)*
Klärwerksablauf	0,1	66(39)	80(54)	125(11)	87(1)	102(12)	n.b.	<LOD	94(18)*
	1,0	100(7)	109(14)	90(8)	106(4)	105(5)	n.b.	<LOD	103(4)*
<i>ohne SPE</i>									
Leitungswasser	0,05	89(16)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	0,15	95(4)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Oberfl.wasser	0,1	106(7)	91(50)	84(0)	100(2)	84(2)	72(46)	78(6)	114(5)*
	1,0	102(4)	94(4)	85(3)	94(7)	86(0)	96(1)	81(3)	105(11)*
Klärwerksablauf	0,1	101(15)	61(29)	70(7)	65(7)	78(6)	75(1)	77(0)	139(21)*
	1,0	103(1)	74(7)	64(1)	78(1)	78(0)	83(1)	66(3)	104(6)*
Klärwerkszulauf	0,3	115(5)	88(28)	48(10)	81(14)	67(16)	59(3)	<LOD	107(3)
	1,3	102(5)	79(1)	46(4)	75(2)	72(2)	60(4)	<LOD	100(1)

\*absolute Wiederfindungsraten, da interner Standard Cetirizin-d<sub>8</sub> für diese Messungen nicht zur Verfügung stand

Ähnliche Ergebnisse ergab eine Analyse von 13 Wasserproben, die sowohl nach SPE-Anreicherung als auch nach Direkteinspritzung untersucht wurden (s. Tabelle 27). Für alle Analyten wurde im Mittel eine Übereinstimmung beider Verfahren zwischen 74 und 115 % erreicht. Eine besonders hohe Korrelation (99 %) wurde für CBZ gefunden, das in dieser Messreihe der einzige Analyt mit eigenem isotoopenmarkierten internen Standard war.

*Tabelle 27: Proben aus 11 Oberflächengewässern und zwei Klärwerksabläufen wurden sowohl nach Direkteinspritzung als auch nach SPE-Anreicherung analysiert. Angegeben sind die Anzahl der Proben über der Nachweisgrenze und das mittlere Verhältnis der Konzentrationen nach beiden Verfahren (in Klammern: relative Standardabweichung). Ergebnisse der Einzelmessungen befinden sich in Tabelle 34. Ergebnisse für Cetirizin ohne Einsatz eines internen Standards.*

Analyt	> LOQ	$C_{\text{direkt}} / C_{\text{SPE}} [\%]$
CBZ	13/13	99 (3)
Cetirizin	6/13	115 (10)
DiOH-CBZ	12/13	83 (3)
EP-CBZ	7/13	74 (6)
10-OH-CBZ	6/13	77 (9)
2-OH-CBZ	6/13	75 (14)
3-OH-CBZ	6/13	75 (7)

Eine Sonderstellung nahm Ox-CBZ ein, das in den angereicherten Proben sowie bei Direkteinspritzung von ungeklärtem Abwasser nicht wiedergefunden wurde. Als Grund hierfür kommt eine Reihe von Faktoren in Frage, zum Beispiel, dass Ox-CBZ während der Probenaufbereitung oder der Lagerung abgebaut wurde. Hierfür spricht die Beobachtung, dass während einer Messserie die Ox-CBZ -Konzentrationen in allen positiven Proben nach 36 Stunden um 50-80 % abgenommen hatten. Die Proben waren dabei im Probengeber des Chromatographen nicht abgedunkelt bei 4°C gelagert. Bei den Abbauprodukten scheint es sich um keinen der ebenfalls untersuchten Metaboliten zu handeln, da deren Konzentrationen gegenüber der ersten Messung unverändert blieben. In den identisch gelagerten Kalibrierlösungen war kein Abbau an Ox-CBZ festzustellen. Offensichtlich findet dieser Abbau nur in einer geeigneten Umgebung statt.

Die gezeigte Methode wurde aus diesen Gründen nicht für die Quantifizierung von Ox-CBZ benutzt. Obschon die Methode prinzipiell geeignet ist, ist für eine sinnvolle Anwendung eine veränderte Probenaufbewahrung nötig, damit Ox-CBZ hinreichend lange stabil ist. Denkbar wären z. B. der Zusatz von Konservierungsmitteln wie Natriumazid oder Ascorbinsäure. Ungeachtet dessen bleibt festzuhalten, dass auch Ox-CBZ in einigen Oberflächengewässern gefunden wurde, wenn auch die Konzentrationen aus den genannten Gründen nicht zuverlässig bestimmt werden konnten.

### Präzision

Die Präzision der Methode wurde anhand von fünf Wasserproben überprüft, die je zweimal an zwei verschiedenen Tagen gemessen wurden (s. Tabelle 28). Im Median betrug die relative Standardabweichung der Messungen eines Tages 1,8 % und diejenige der Messungen an verschiedenen Tagen 2,8 %.



Tabelle 28: 5 Oberflächenwasserproben wurden per LC-MS/MS an zwei verschiedenen Tagen je zweimal gemessen. Angegeben ist die relative Standardabweichung (RSD) der Messwerte innerhalb eines Tages (intra-assay) und zwischen den verschiedenen Tagen (inter-assay). Die Proben wurden ohne vorherige Festphasenanreicherung injiziert.

	$c_{\text{CBZ}}$ [ $\mu\text{g/L}$ ]	Wiederholbarkeit, RSD	
		Inter-assay (n = 2)	Intra-assay (n = 2)
Probe 1	0,76	2,0 %	1,3 %
Probe 2	0,53	2,8 %	1,6 %
Probe 3	0,47	2,6 %	1,8 %
Probe 4	0,28	5,6 %	2,0 %
Probe 5	0,33	3,2 %	3,6 %
Median		2,8 %	1,8 %

## 4.7 Untersuchung von Gewässerproben

Die abschließende Aufgabe nach der Erstellung und Optimierung des ELISAs war die Überprüfung, ob und wie gut sich das Testsystem für die Analyse von verschiedenen Gewässerproben eignet. Hierzu wurden die Abwässer aller Berliner Klärwerke, zahlreiche Oberflächengewässer sowie Trinkwasser überprüft. Gleichzeitig wurde diese Gelegenheit genutzt, um das Auftreten von CBZ im Berliner Gewässersystem näher zu charakterisieren.

Um den Einfluss etwaiger örtlicher und saisonaler Verschiedenheiten in der Probenzusammensetzung zu überprüfen, wurden dabei zum einen Proben aus möglichst vielen verschiedenen Quellen untersucht, zum anderen wurde in ausgewählten Fällen wiederholt dieselbe Stelle beprobt.

Zusätzlich zu den hier diskutierten Ergebnissen wurde in einem Gemeinschaftsprojekt mit der Universität Aveiro außerdem Abwasser, Oberflächenwasser sowie Meerwasser aus Portugal untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden gesondert veröffentlicht [306] und werden im Folgenden nicht näher thematisiert.

### 4.7.1 Abwasser

#### *Situation in den sechs Berliner Klärwerken*

Aus allen Klärwerken wurden von den Berliner Wasserbetrieben 24-Stunden-Mischproben aus Zulauf und Ablauf bereitgestellt. Abbildung 50 zeigt die Konzentrationen von CBZ und Cetirizin, die in diesen Proben mit ELISA und LC-MS/MS ermittelt wurden. Der CBZ-Gehalt lag in der Regel auf einem relativ einheitlichen Niveau zwischen 1,5 und 2,6  $\mu\text{g/L}$  (LC-MS/MS). Einzig im Klärwerkszulauf Ruhleben wurde mit 5,0  $\mu\text{g/L}$  eine etwa doppelt so hohe Konzentration gefunden. Dieser Wert ist auch deswegen auffällig, weil im Ablauf dieses Klärwerks, der einen Tag später beprobt wurde, eine deutlich niedrigere CBZ-Konzentration von 1,6  $\mu\text{g/L}$  gefunden wurde. Für diese Diskrepanz konnte auch nach Rücksprache mit der Betreibergesellschaft keine unmittelbare Erklärung gefunden werden. An den beiden Tagen der Probennahme fiel kein bzw. nur geringer Niederschlag (1,6 mm),

so dass eine Verdünnung durch Regenwasser als Grund für den Konzentrationsunterschied auszuschließen ist.

In allen anderen Klärwerken war die CBZ-Konzentration im Ablauf im Durchschnitt um 14 % höher als im Zulauf. Für diesen bereits früher berichteten Befund ist vermutlich die Spaltung des Metaboliten CBZ-N-Glucuronid verantwortlich. Die Höhe der CBZ-Konzentration stimmt gut überein mit früheren Studien des Berliner Abwassers [123].

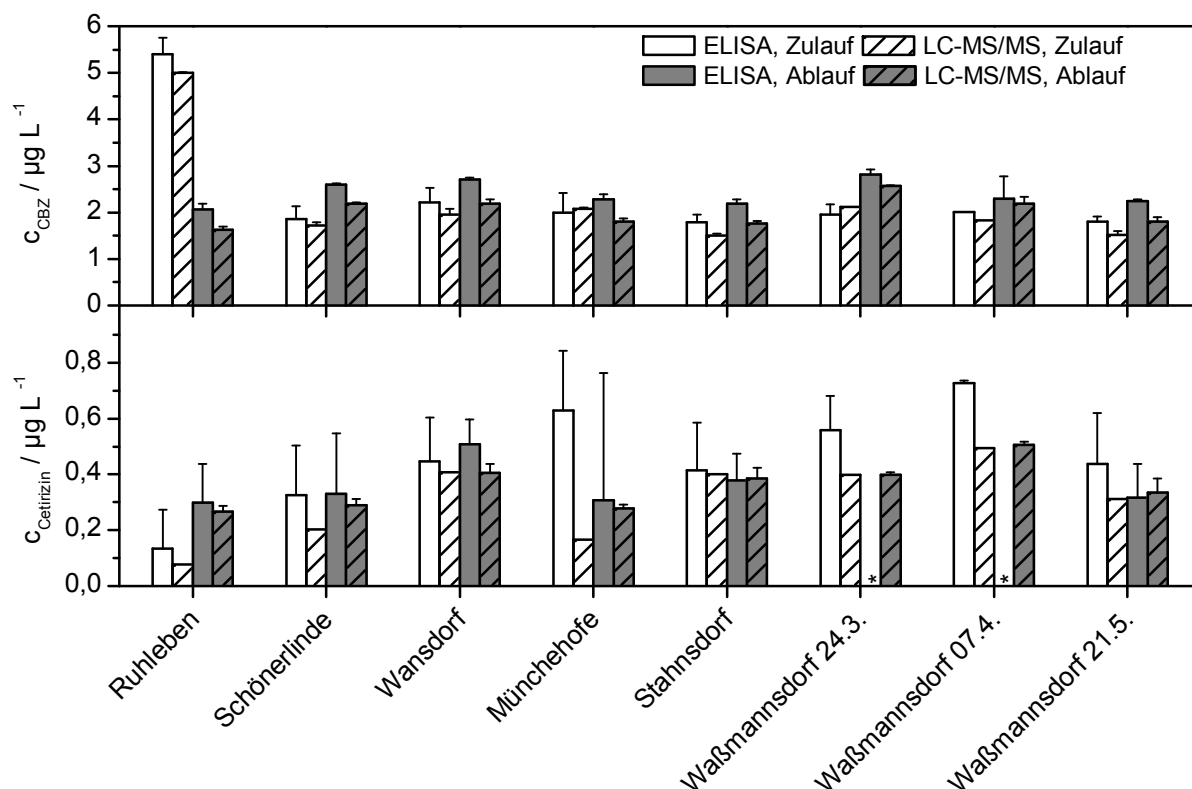


Abbildung 50: Der Gehalt an CBZ und Cetirizin wurde in sechs Berliner Klärwerken im Jahr 2010 mit ELISA ( $n = 2$ ) und LC-MS/MS ( $n = 1$  oder  $2$ ) bestimmt. Siehe auch Tabelle 36. Mit Sternchen versehene Proben wurden nicht gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $n$  Messungen. Die per ELISA bestimmten Cetirizin-Konzentrationen wurden aus zwei Messungen bei pH 4,5 und pH 10,5 berechnet, die zugehörige Standardabweichung wurde nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung errechnet.

Die Median-Konzentration von Cetirizin in den sechs Klärwerken betrug sowohl im Zulauf als auch im Ablauf  $0,36 \mu\text{g/L}$  (LC-MS/MS). Die ELISA-Ergebnisse deuten im Gegensatz dazu einen ca. 10 %igen Cetirizin-Abbau im Klärwerk an, der allerdings aufgrund der relativ niedrigen Präzision der Methode nicht signifikant sein dürfte. Die Übereinstimmung zwischen ELISA und LC-MS/MS war in den meisten Fällen zufriedenstellend.

Anzumerken ist, dass die mit dem ELISA bestimmten Cetirizin-Konzentrationen wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben berechnet wurden. Die Messunsicherheit wurde ebenfalls berechnet, indem nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung die durch beide ELISA-Platten anfallenden Fehlerbeiträge addiert wurden. Hierdurch wird allerdings außer Acht gelassen, dass ein erheblicher Teil der Varianz innerhalb einer ELISA-Platte durch die Plattendrift erzeugt wird, die durch eine geeignete Verteilung von Proben und Kalibratoren weitgehend

neutralisiert werden kann. Diese Kompensation äußert sich zwar in einer deutlich verbesserten Richtigkeit der Analysenergebnisse, gleichzeitig führt sie rechnerisch zu einer höheren Streuung der Messwerte innerhalb einer Platte. Dies erklärt die in Abbildung 50 und in späteren Kapiteln gezeigte relativ hohe Messunsicherheit bei der Bestimmung von Cetirizin mit dem ELISA. Die gute Übereinstimmung zwischen ELISA und LC-MS/MS mag als Indiz dafür gelten, dass die tatsächliche Messunsicherheit deutlich niedriger sein dürfte als berechnet.

#### *Zeitliche Varianz der Analytkonzentrationen am Beispiel des Klärwerks Waßmannsdorf*

Die zeitliche Variation der Konzentration von CBZ und Cetirizin im Klärwerksablauf wurde am Beispiel des Klärwerks Waßmannsdorf untersucht. Dabei wurden sowohl die Konzentrationsveränderungen innerhalb eines Tages als auch über mehrere Monate hinweg beobachtet.

Von den Berliner Wasserbetrieben wurden zweimal je zwölf 2-Stunden-Mischproben zur Verfügung gestellt, die am 24.3. und 7.4.2010 dem Klärwerksablauf Waßmannsdorf entnommen wurden. An beiden Tagen wurden annähernd konstante Konzentration von CBZ gemessen, wobei zwischen den Ergebnissen von ELISA und LC-MS/MS nur ein geringfügiger Unterschied bestand (s. Abbildung 51a). Der CBZ-Pegel zeigt also nur geringe Schwankungen innerhalb eines Tages, was auch von Nelson et al. berichtet worden ist [112].

Auch in den acht 24-Stunden-Mischproben (s. Abbildung 51b), die vom 24.3. bis 7.4.2010 im Abstand von je zwei Tagen gesammelt wurden, waren die Konzentrationsschwankungen gering. Im beobachteten Zeitraum betrug die Differenz zwischen dem größten Wert (2,6 µg/L) und dem kleinsten Wert (1,9 µg/L) etwa 25 %. An allen Wochentagen wurden ähnliche Konzentrationen gemessen, ein Einfluss des Wochenendes auf die Analytkonzentration konnte damit anders als bei den Markern Benzoylcegonin [356] und medizinischen Kontrastmitteln [109, 111] nicht festgestellt werden. Eine nur geringe wöchentliche Varianz der CBZ-Konzentration im Klärwerksablauf ist auch von Kreuzinger berichtet worden [366].

Darüber hinaus wurden zwischen März und August 2010 mehrmals pro Woche Schöpfproben aus dem Klärwerksablauf entnommen. Aus logistischen Gründen wurden keine Mischproben gesammelt, was aufgrund der geschilderten geringen Varianz im Kurzzeitbereich als wenig problematisch gelten kann. Die Analyse mit dem ELISA ergab im Median eine CBZ-Konzentration von 2,1 µg/L. Erwähnenswert sind extrem hohe CBZ-Konzentrationen von 4,5 bzw. 4,4 µg/L, die am 16.3. und am darauffolgenden Tag gemessen wurden. Am 22.3. war der CBZ-Pegel mit 3,5 µg/L immer noch deutlich erhöht und erst am darauffolgenden Tag mit 2,4 µg/L etwa wieder auf dem ursprünglichen Niveau. Diese ungewöhnlichen Werte konnten mit LC-MS/MS bestätigt werden.

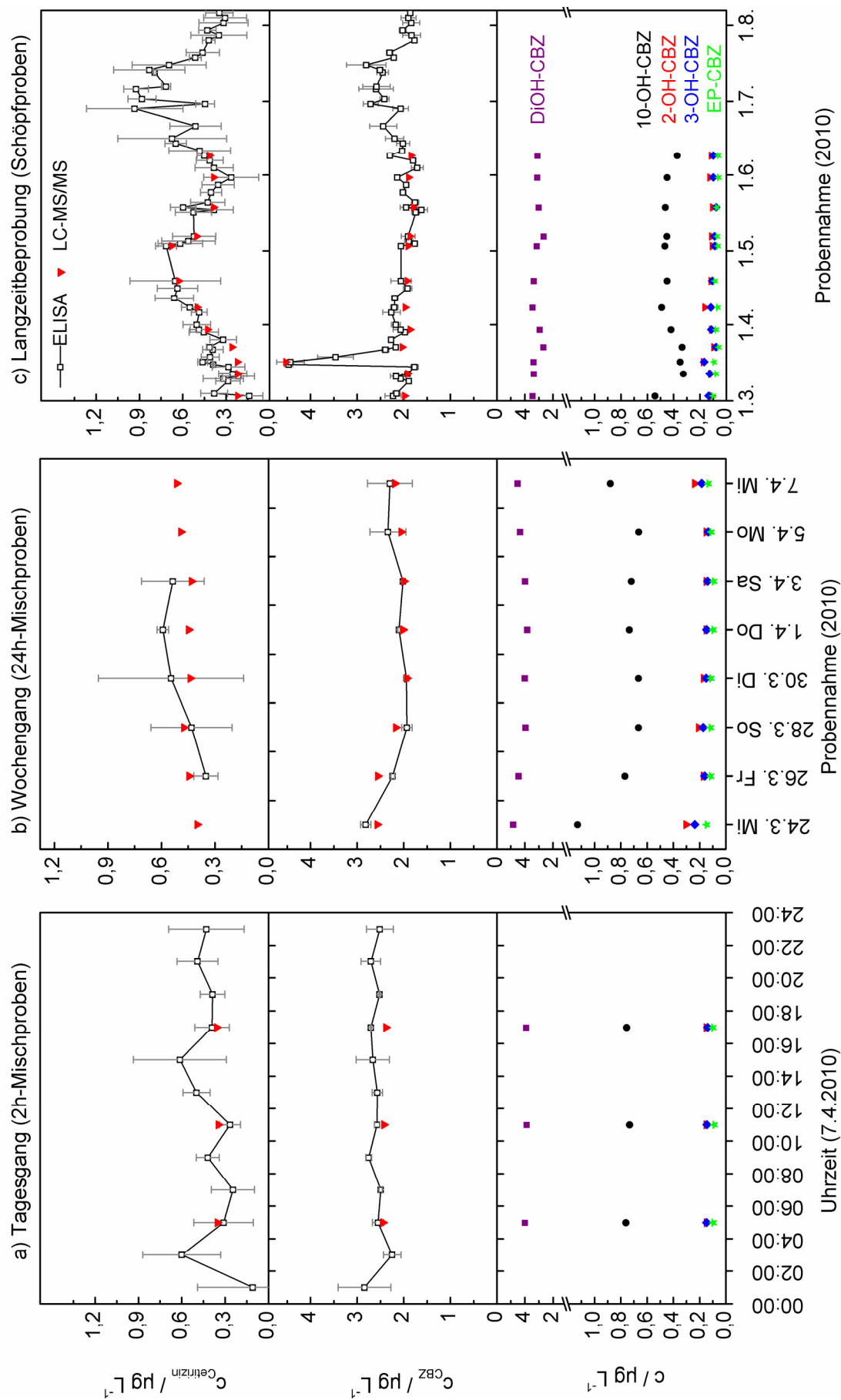


Abbildung 51: Aus dem Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf wurden 2h-Mischproben (a), 24h-Mischproben (b) und Schöpfproben (c) entnommen. In den Proben wurden per ELISA ( $n = 2$  oder  $3$ ) Cetirizin und CBZ bestimmt, weitere Analyten wurden zudem in einigen Proben mit LC-MS/MS ( $n = 1$ ) quantifiziert. Zu den Ergebnissen von ELISA und LC-MS/MS siehe auch Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 37.

Eine Rücksprache mit den Berliner Wasserbetrieben ergab keine ungewöhnlichen Vorfälle im Klärwerksbetrieb sowie keine auffälligen Analyseergebnisse bei den routinemäßig erhobenen anorganischen Messparametern. Die Wetterverhältnisse lieferten ebenfalls keine offensichtliche Erklärung<sup>2</sup>. Interessant ist an dieser Stelle der Blick auf die Konzentration des Metaboliten DiOH-CBZ, der in den menschlichen Ausscheidungen sowie in Abwässern und Oberflächengewässern in höheren Konzentrationen als CBZ selbst vorkommt. Die Konzentration von DiOH-CBZ blieb im Abwasser über den gesamten beobachteten Zeitraum im Bereich zwischen 2,6 und 3,4 µg/L und stieg auch in den Proben mit auffällig hohen CBZ-Werten nicht an. Auch in der Probe aus dem Klärwerkszulauf Ruhleben, die ebenfalls eine ungewöhnlich hohe CBZ-Konzentration von 5 µg/L aufwies, wurde keine erhöhte Konzentration von DiOH-CBZ festgestellt. Dies legt den Schluss nahe, dass die erhöhten CBZ-Konzentrationen an den fraglichen Tagen nicht durch einen erhöhten Verbrauch an CBZ verursacht wurden.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass im Klärwerk aus unbekannten Gründen mehr CBZ-N-Glucuronid zu CBZ umgesetzt wurde als dies normalerweise der Fall ist (s. Kapitel 2.2.4). Eine vollständige Spaltung des ausgeschiedenen CBZ-N-Glucuronids würde die Konzentration von CBZ annähernd verdoppeln und die beobachteten Konzentrationsmaxima ließen sich erklären.

Denkbar ist weiterhin, dass nicht mehr benötigte CBZ-Tabletten über die Toilette entsorgt wurden. Für die beobachteten Steigerungen im Klärwerk Waßmannsdorf wären etwa 400 g CBZ pro Tag nötig, was angesichts von Packungsgrößen mit bis zu 120 g auf dem deutschen Markt durchaus möglich, wenn auch nicht sehr wahrscheinlich wäre.

Ähnlich wie bei CBZ blieb die Konzentration von Cetirizin innerhalb eines Tages und innerhalb einer Woche relativ konstant (s. Abbildung 51), wobei hier wieder die hohe Messunsicherheit des ELISAs sichtbar wurde. Auf die saisonalen Schwankungen der Cetirizin-Konzentration wird in Kapitel 4.7.4 gesondert eingegangen.

Genau wie CBZ war auch die Konzentration der übrigen CBZ-Metaboliten im Klärwerksablauf annähernd konstant. Nur 10-OH-CBZ, der Hauptmetabolit von Ox-CBZ, zeigte deutliche Schwankungen.

## 4.7.2 Oberflächenwasser

### *Teltowkanal*

CBZ gelangt in erster Linie durch die Einleitung von Abwasser in die Umwelt. Der Teltowkanal ist ein eindrucksvolles Beispiel für den großen Einfluss, den Abwasser auf die Belastung eines Gewässers mit organischen Spurenstoffen haben kann. Als wichtigster Eintragspfad des Berliner Abwassers wurde für diesen Kanal untersucht, mit welchen räumlichen und zeitlichen Varianzen bei der Beprobung von Gewässern zu rechnen ist.

---

<sup>2</sup> Am 15.3. und 16.3. gab es keine oder nur geringe Niederschläge. Erwähnenswert ist, dass ab dem 9.3. das Wetter deutlich wärmer wurde, wodurch der größte Teil des angesammelten Schnees abtaute. Aufgrund der zeitlichen Differenz von einer Woche erscheint es allerdings unwahrscheinlich, dass dieser Wetterumschwung für die beobachtete Anomalie verantwortlich ist.

Hierzu wurde die Umgebung des Klärwerksablaufs Waßmannsdorf zwischen den Flusskilometern 28 und 38 beprobt. Diese Beprobung geschah einmal an einem sehr regenreichen Tag (1.10.2008) und ein zweites Mal an einem überwiegend trockenen Tag (28.2.2009). Der Einfluss der beiden Abwassereinleitungsstellen bei km 32,2 und 34,7 war an beiden Tagen deutlich an einem Anstieg der CBZ-Konzentration von 0,05 µg/L auf über 2 µg/L zu erkennen (s. Abbildung 52). Am 28.2.2009 stimmten die beiden beobachteten lokalen Extremwerte nahezu exakt mit diesen Einleitungsstellen überein. Hingegen stieg am 1.10.2008 bereits 800 m vor dem Klärwerksablauf die CBZ-Konzentration an und das Maximum lag ca. 200 m davor. Diese Beobachtung lässt sich mit den hohen Niederschlägen an diesem Tag erklären. Zwischen km 29 und km 35 wird durch zahlreiche Ableitungskanäle das Regenwasser der umliegenden Gebiete in den Teltowkanal geleitet (s. Abbildung 62). Die großen Mengen an Regenwasser sorgten an diesem Tag offenbar dafür, dass sich das Abwasser zumindest oberflächlich mehrere hundert Meter weit entgegen der eigentlichen Fließrichtung bewegte.

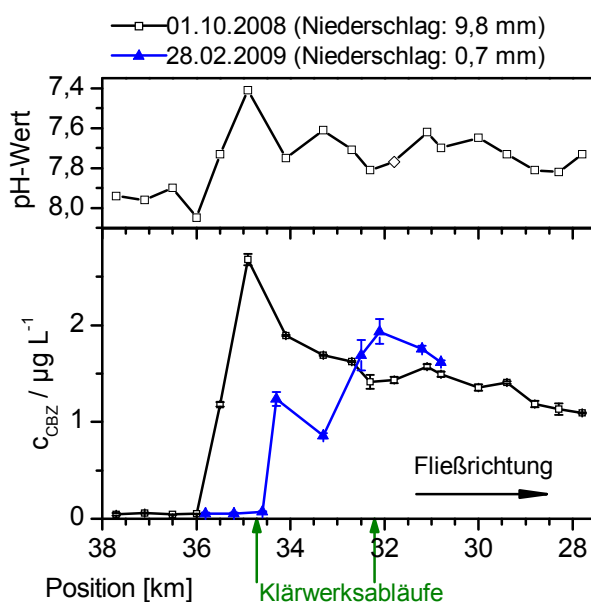
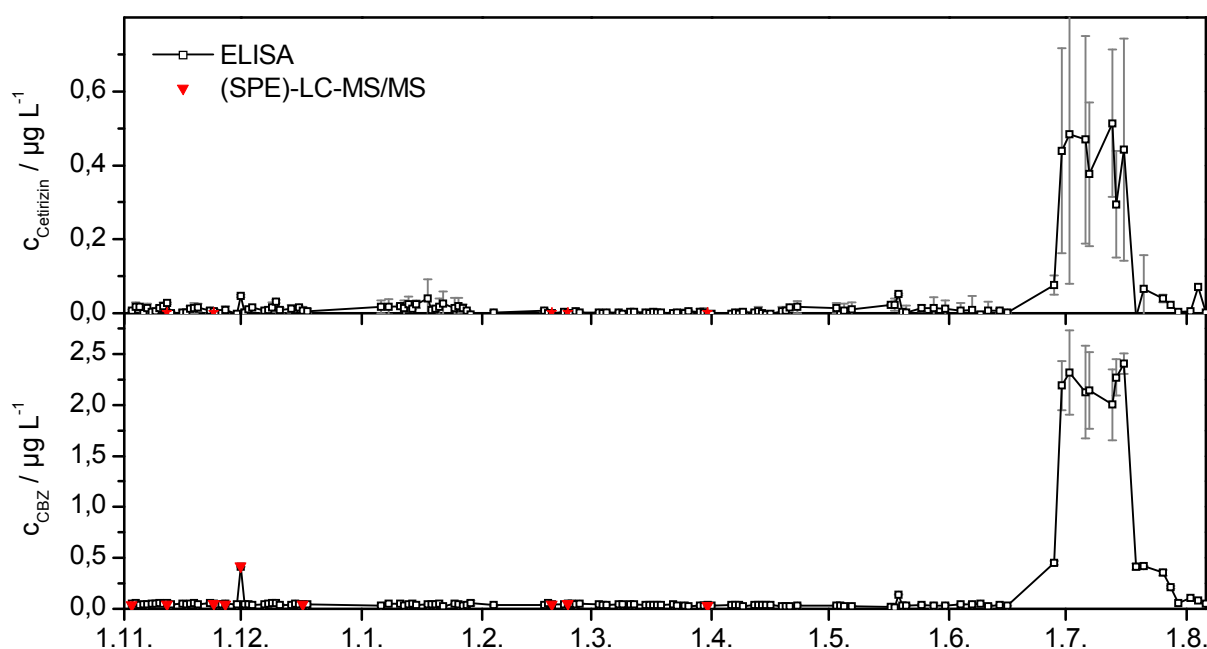


Abbildung 52: Am 1.10.2008 und 28.2.2009 wurden Schöpfproben vom Ufer des Teltowkanals genommen und die Konzentration von CBZ bestimmt (ELISA, pH 7,6). Am 1.10.2008 wurde außerdem der pH-Wert gemessen. Bei km 32,2 und 34,7 befinden sich die beiden Abläufe des Klärwerks Waßmannsdorf; Quelle der Niederschlagsinformationen: Deutscher Wetterdienst, Station Berlin-Tempelhof.

Der Klärwerksablauf hatte auch einen Einfluss auf den pH-Wert, der am 1.10.2008 von 7,9 auf 7,4 sank.

Um die zeitliche Varianz zu beleuchten, wurden zwischen November 2009 und August 2010 mehrmals pro Woche Proben von zwei Positionen am Teltowkanal genommen, einmal stromaufwärts von Klärwerk Waßmannsdorf und einmal stromabwärts. Abbildung 53 zeigt die dort gemessenen Konzentrationen von CBZ und Cetirizin.

a) Teltowkanal stromaufwärts des Ablaufs von Klärwerk Waßmannsdorf (km 35,5)



b) Teltowkanal stromabwärts des Ablaufs von Klärwerk Waßmannsdorf (km 34,4)

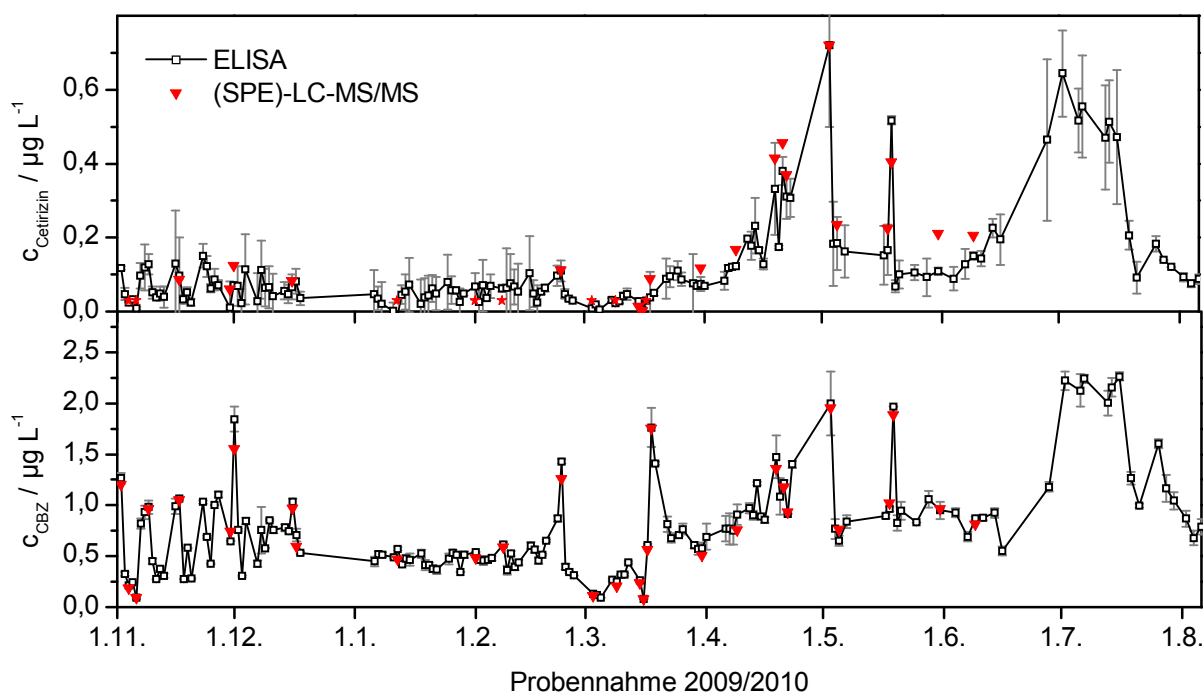


Abbildung 53: Zwischen November 2009 bis August 2010 wurden an zwei Stellen Proben aus dem Teltowkanal entnommen und mit ELISA und LC-MS/MS analysiert. Messwerte unterhalb der Bestimmungsgrenze sind als Stern auf halber Höhe der Nachweisgrenze eingetragen. Zu den Messwerten siehe auch Tabelle 32 (ELISA) und Tabelle 33 (LC-MS/MS).

Über den größten Teil des Jahres lagen die Konzentrationen von CBZ und Cetirizin stromaufwärts des Klärwerksablaufs unterhalb von  $0,1 \mu\text{g/L}$ . Dieser Schwellenwert wurde im Juli 2010 über mehrere Wochen hinweg drastisch überschritten und die dort gemessenen Konzentrationen näherten sich den Werten an, die im Klärwerksablauf selbst gemessen

wurden (s. Kapitel 4.7.1). Diese Beobachtung kann mit einer Umkehrung der Fließrichtung aufgrund der geringen Frischwasserzufuhr in dieser Trockenperiode erklärt werden (s. Kapitel 2.2.2). Neben der Trockenheit trägt auch die Wiederbefüllung von Grundwasserspeichern, die zu DDR-Zeiten für den Braunkohletagebau entwässert wurden, zur Wasserknappheit in der Spree bei [142].

Darüber hinaus wurde am 1.12.2009 eine deutliche erhöhte CBZ-Konzentration von 0,4 µg/L gemessen. An diesem Tag und am vorigen Tag wurden starke Regenfälle von 5,6 mm bzw. 7,6 mm gemessen, die vermutlich ähnlich wie am 1.10.2008 eine partielle Umkehrung der Fließrichtung bedingten.

Stromabwärts des Klärwerks wurden erwartungsgemäß deutliche höhere Konzentrationen von CBZ und Cetirizin gemessen als stromaufwärts. Die Analytkonzentrationen unterlagen dabei starken tagesabhängigen Schwankungen. Da die Proben nur 300 m hinter dem Ablauf genommen wurden, ist von einer unvollständigen Vermischung auszugehen. Außerdem können die Flussraten des Teltowkanals und des Klärwerksablaufs zeitlichen Schwankungen unterliegen, die zu verschiedenen starken Verdünnungen führen. Im Juli 2010 wurden stromaufwärts und stromabwärts des Klärwerks annähernd die gleichen Konzentrationen gefunden, was auf den bereits erwähnten mangelnden Frischwasserzufluss zurückzuführen ist.

### *Übriges Stadtgebiet*

Die beiden Hauptfließgewässer Berlins, Spree und Havel, waren vor dem Eintritt ins Stadtgebiet mit weniger als 0,1 µg/L CBZ sehr gering belastet (s. Abbildung 54). Im Großen Müggelsee wurden ganzjährig geringe CBZ-Konzentrationen um 0,05 µg/L vorgefunden. Ähnliche Werte zwischen 0,05 und 0,1 µg/L wurden in der Dahme und in der Spree westlich des Großen Müggelsees – mit Ausnahme der Trockenperioden im August 2008 und Juli 2010 - wiederholt an verschiedenen Stellen gefunden (s. Tabelle 39) und können somit als die übliche Konzentration bei normalen Fließgeschwindigkeiten betrachtet werden.

Eine Punktquelle für den CBZ-Eintrag in die Spree ist das Neuenhagener Mühlenfließ, in dem ähnlich hohe CBZ-Konzentrationen wie im Teltowkanal gefunden wurden. Nach der Klarwassereinleitung des Klärwerks Münchehofe wurden hier mit 2 µg/L annähernd so hohe CBZ-Pegel gefunden wie im Ablauf des Klärwerks selbst. Im Bereich der Einmündung des Neuenhagener Mühlenfließ' in die Spree wurde entsprechend eine deutlich höhere Schadstoffkonzentration gemessen als in den umliegenden Abschnitten der Spree. In Trockenperioden war wegen der geringeren Fließgeschwindigkeit der Spree dieser Einfluss stärker wahrnehmbar. So wurde im Juli 2010 mit 0,5 µg/L eine etwa dreimal so hohe CBZ-Konzentration gemessen wie im März 2010.

Im Juli 2010 war darüber hinaus wegen des langsameren Stofftransports im gesamten beprobten Spreeabschnitt zwischen Großem Müggelsee und der Mündung des Britzer Verbindungskanals sowie in der Dahme bis hin zum Langen See eine deutlich erhöhte CBZ-Konzentration zwischen 0,15 und 0,5 µg/L zu beobachten (s. Abbildung 54b). In der Dahme wurde im Bereich der Einmündung des Teltowkanals die höchste Konzentration gemessen. Diese war mit 0,24 µg/L etwa fünfmal so hoch wie im Rest des Jahres. Dies bestätigt die



bereits erwähnte Vermutung, dass in diesem Zeitraum das Wasser aus dem Teltowkanal in die Dahme floss und nicht umgekehrt.

Im Landwehrkanal wurden im Dezember 2009 mit 0,07 bis 0,18 µg/L etwas höhere CBZ-Konzentrationen gefunden als in der Spree. Dies kann durch die Zufuhr von Rohabwasser während eines Regenwasserüberlaufereignisses geschehen sein oder durch ein Einströmen von belastetem Wasser aus dem benachbarten Teltowkanal.

Im Berlin-Spandauer Schifffahrtskanal wurden an allen beprobten Stellen niedrige CBZ-Konzentrationen gefunden. Auch im Bereich des Zuflusses der Panke blieb diese Konzentration auf demselben Niveau wie in der Spree. Demnach wurde im Beprobungszeitraum durch die Panke nur eine vernachlässigbare Menge an Abwasser aus dem Klärwerk Schönerlinde eingetragen.

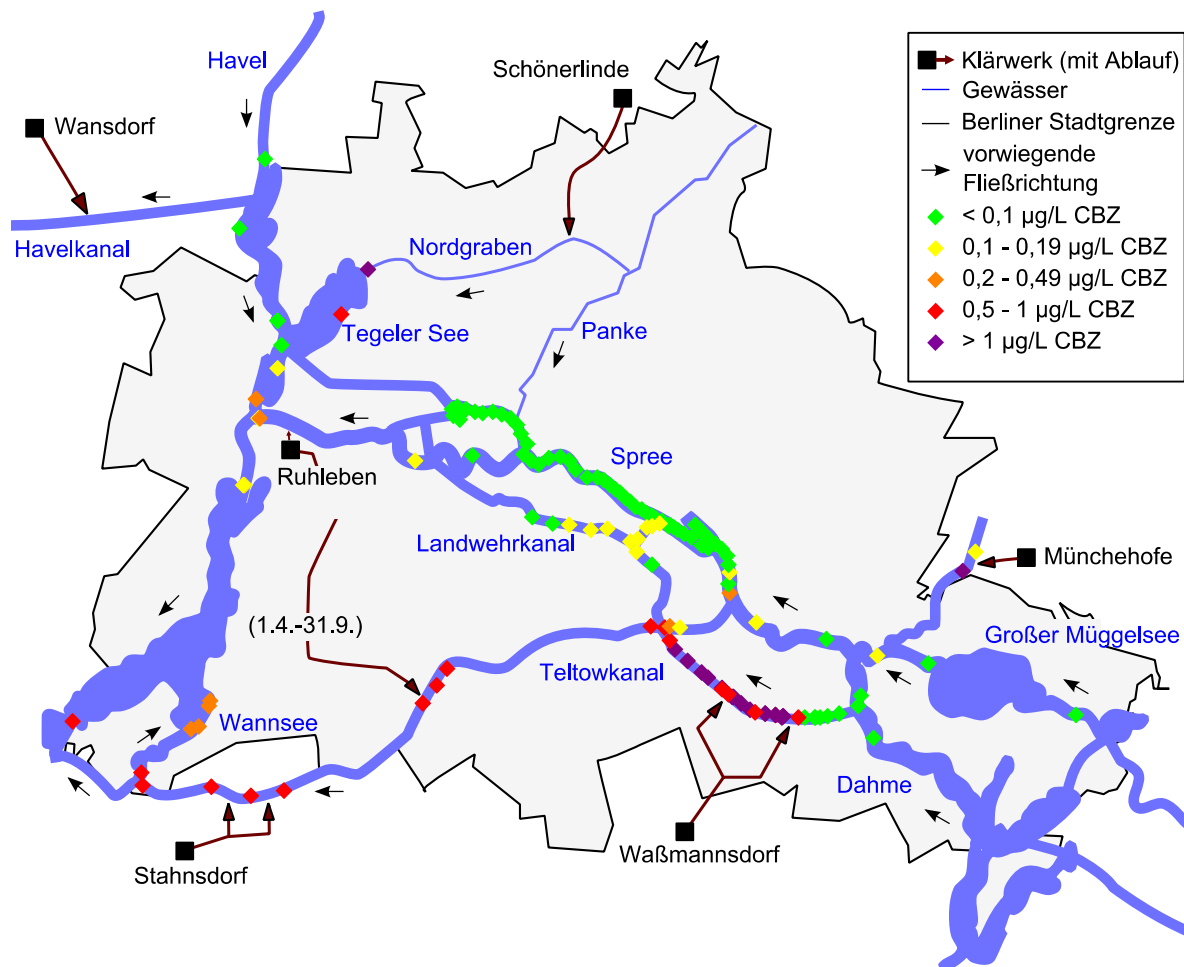
In der Havel waren im Bereich der nördlichen Stadtgrenze nur sehr geringe CBZ-Konzentrationen messbar (0,03 bis 0,04 µg/L). Im Spandauer See war ein deutlicher Konzentrationsanstieg auf bis zu 0,44 µg/L zu verzeichnen. Hier macht sich die Einleitung von geklärtem Abwasser aus dem Klärwerk Schönerlinde bemerkbar, das über den Nordgraben und den Tegeler See in die Havel gelangte. Bei der Mündung des Nordgrabens direkt hinter der Oberflächenwasseraufbereitungsanlage Tegel wurde hier eine Konzentration von 1,4 µg/L CBZ gefunden, am Seeufer weiter südlich 0,74 µg/L. Nach dem Zufluss der Spree verringerte sich die CBZ-Konzentration in der Havel und erreichte Werte zwischen 0,1 und 0,3 µg/L.

Bemerkenswert ist, dass die CBZ-Konzentration im weiter südlich gelegenen Wannsee, einem der Hauptbadegewässer Berlins, im Sommer nicht niedriger war als im Winter, obwohl in den Sommermonaten zur Verbesserung der Wasserqualität das Abwasser des Klärwerks Ruhleben über eine Druckrohrleitung in den Teltowkanal statt in die Spree gepumpt wurde. Im Zeitraum von Juni 2009 bis März 2010 blieb die CBZ-Konzentration im Wannsee bei vier Beprobungen relativ konstant zwischen 0,27 und 0,36 µg/L. Offenbar fließt über den Umweg Teltowkanal/Griebnitzkanal letztlich eine ähnliche Menge Abwasser in den Wannsee wie im Winter über die Spree.

An der Unterhavel in der Nähe des Zuflusses des Teltowkanals wurde bei der einzigen dort erhobenen Probe eine sehr hohe CBZ-Konzentration von 0,83 µg/L gemessen. Somit hatte sich die CBZ-Konzentration in der Havel während der Passage durch das Berliner Stadtgebiet verzwanzigfacht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der menschliche Eintrag in die Gewässer über den Marker CBZ sehr deutlich nachweisbar ist. Der Weg des Abwassers vom Klärwerk in das Oberflächengewässer sowie der weitere Verlauf lassen sich gut nachvollziehen. Wie am Fall des Teltowkanals gezeigt, lassen sich hiermit sogar Änderungen im Strömungsverhalten erkennen.

a) Situation bei normalen Fließgeschwindigkeiten (September-Juni)



b) Situation bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten (Juli-August)

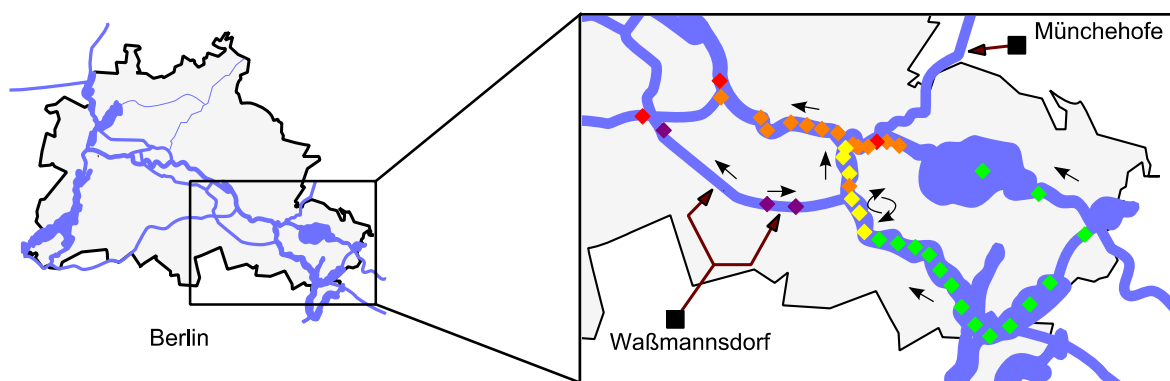


Abbildung 54: Verbreitung von CBZ im Berliner Stadtgebiet. Proben wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren (Juli 2008-Juli 2010) gesammelt und mittels ELISA gemessen. a) Messwerte ohne August 2008 und Juli 2010, b) Messwerte aus August 2008 und Juli 2010 (Werte in Klammern: mittlere Abflussrate in 2006 [140]). Siehe auch Tabelle 39.

### 4.7.3 Trinkwasser

Der ELISA ist insbesondere für den Einsatz in der Trinkwasseranalytik von Interesse, da nach aktuellem Stand einzig für diesen Wassertyp ein Grenzwert existiert: der gesundheitliche Orientierungswert (GOW, s. Kapitel 2.2.6).

Die Verteilung von CBZ im Berliner Trinkwasser wurde von Kirsten Pannenbecker mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten ELISA eingehend untersucht. Die Messergebnisse sowie die Methodvalidierung sind detailliert in ihrer Diplomarbeit dokumentiert [305]. An dieser Stelle sollen nur kurz die wichtigsten Ergebnisse wiedergegeben werden.

In den Monaten Januar und März 2010 wurden in den Probennahmestellen des Versorgungsnetzes im Bereich zwischen Stadtzentrum und dem Tegeler See mit bis zu 160 ng/L die höchsten CBZ-Konzentrationen gefunden (s. Abbildung 55). In den Bezirken, die sich hieran südlich anschließen, wurden ebenfalls erhöhte CBZ-Konzentrationen gefunden. In vielen Fällen betrug der CBZ-Gehalt hier mehr als 50 ng/L. Im Norden und Osten Berlins sowie im äußersten Westen konnte hingegen in vielen Fällen kein CBZ nachgewiesen werden. In keinem Fall wurde der GOW von 300 ng/L überschritten.

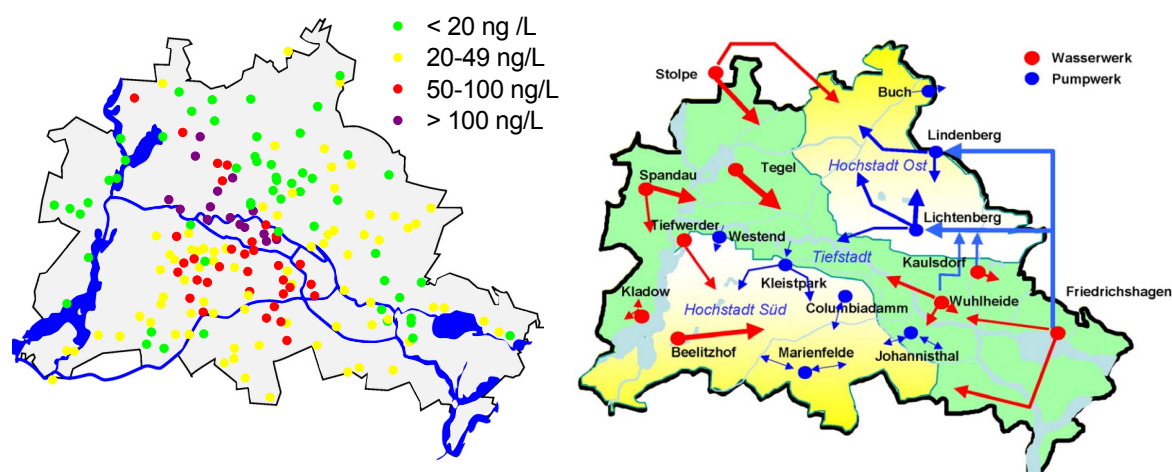


Abbildung 55: Links: Die CBZ-Konzentration von 179 Trinkwasserproben aus dem Rohrnetz der Berliner Wasserbetriebe wurde im Januar 2010 mittels ELISA bestimmt, siehe auch Tabelle 38. Rechts: Verteilungsmöglichkeiten für Trinkwasser im Berliner Stadtgebiet (Bildquelle: BWB [140]).

Diese Stoffverteilung lässt sich durch die individuelle Belastung der Wasserwerke erklären. Die Stadtviertel, in denen besonders viel CBZ im Leitungswasser gefunden wurde, wurden hauptsächlich von den Wasserwerken Tegel und Beelitzhof versorgt (s. Abbildung 55 rechts). Von den acht derzeit betriebenen Wasserwerken sind nach einer Studie aus dem Jahr 2002 besonders das Wasserwerk Tegel und in geringerem Maße das Wasserwerk Beelitzhof mit CBZ belastet (s. Kapitel 2.2.2). Mit beobachteten Konzentrationen von 100 bis 150 ng/L CBZ im Wasserwerk Tegel wurde bei einer erneuten Untersuchung im März 2010 dieser Befund bestätigt.

Die gezeigten Ergebnisse sind insbesondere für den Wasserversorger interessant. Das Trinkwasser wird über ein weitverzweigtes Rohrsystem mit mehreren Pumpstationen verteilt. Die Förderleistungen der Wasserwerke sowie der Wasserbedarf im Stadtgebiet können

variieren, so dass aufwendige mathematische Modelle nötig sind um vorherzusagen, welcher Stadtbezirk von welchem Wasserwerk versorgt wird. Die Untersuchungen mit dem ELISA konnten hierbei wertvolle Daten liefern, um eine Überprüfung der theoretischen Vorhersagen zu ermöglichen.

Darüber hinaus wurden elf Mineralwässer aus verschiedenen europäischen Ländern auf ihren CBZ-Gehalt untersucht. Dieselben Proben wurden von Carvalho auf ihren Koffeingehalt untersucht [298]. In keiner der Proben war Koffein oder CBZ nachweisbar.

#### 4.7.4 Saisonale Schwankungen des Cetirizin-Pegels

Die vorangegangenen Abschnitte haben gezeigt, dass Cetirizin im Klärwerksablauf und im Teltowkanal über den gesamten beobachteten Zeitraum vorzufinden ist. Die höchsten Konzentrationen traten dabei während der Heuschnupfenzeit zwischen März und August auf. Im Oberflächenwasser führten variierende Fließgeschwindigkeiten und damit größere tagesabhängige Schwankungen zu einem schwierigeren zu interpretierenden Konzentrationsverlauf (s. Abbildung 53b). Da die CBZ-Konzentration in geklärtem Abwasser in der Regel annähernd konstant ist (s. Kapitel 4.7.1), lässt sich durch die Bildung des Verhältnisses der Konzentrationen von Cetirizin und CBZ die Verdünnung bei der Einleitung in den Teltowkanal kompensieren. In Abbildung 56 wird ersichtlich, dass zwischen diesem Verhältnis und dem saisonalen Auftreten von Pollen eine offensichtliche Korrelation besteht. Ein ähnlicher Anstieg der Cetirizinkonzentration im Abwasser zur Heuschnupfenzeit ist aus Finnland bekannt [355].

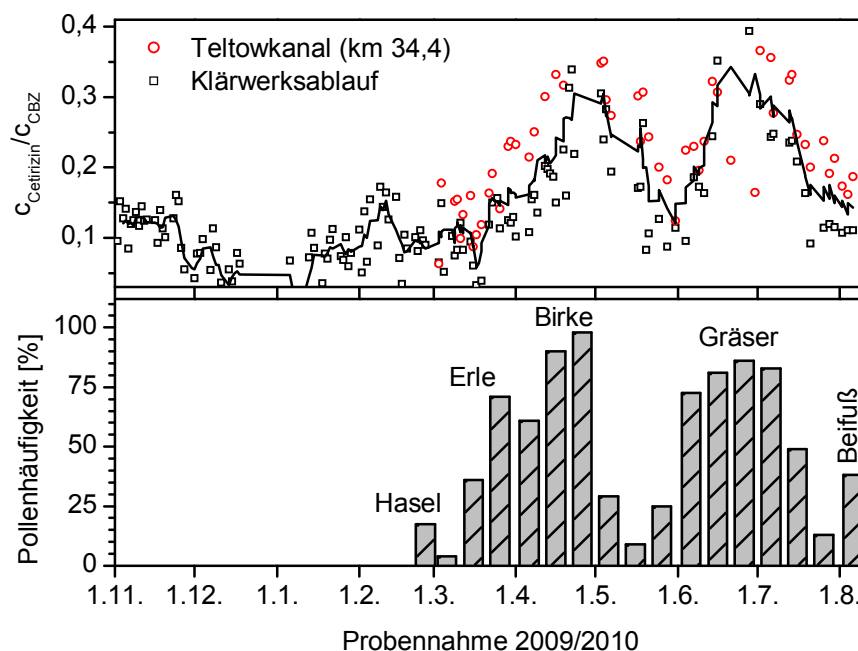


Abbildung 56: Oben: Verhältnis der Konzentrationen (m/v) Cetirizin/CBZ im Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf (Quadrate) und im Teltowkanal bei km 34,4 (Kreise), mit gleitendem Durchschnitt aus fünf benachbarten Punkten. Unten: Häufigkeit von mittleren und hohen Pollenkonzentrationen in Zehntagesperioden in Pollenfallen in und um Berlin (Quelle: Deutscher Wetterdienst).

## 4.8 Auftreten der CBZ-Metaboliten in Gewässern

### 4.8.1 Qualitative Untersuchungen

Um einen qualitativen Eindruck über die Persistenz der CBZ-Metaboliten zu gewinnen, wurden die MRM-Chromatogramme der Metaboliten in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser verglichen. Neben einem halbquantitativen Einblick in den Stoffabbau kann dies auch Informationen über die entstehenden Produkte erbringen, da diese bei leicht spaltbarer Funktionalisierung denselben Massenübergang wie das Edukt zeigen können.

Als Oberflächenwasserprobe wurde bewusst eine gering belastete Probe aus dem Einzugsgebiet der Dahme gewählt. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass der CBZ-Eintrag mit guter Wahrscheinlichkeit schon einige Tage zurücklag und somit ein Abbau in der Umwelt potentiell stattfinden konnte.

#### *10-OH-CBZ*

Nach dem Verlust von einem Äquivalent Wasser ( $255 \rightarrow 237$ ) zeigt 10-OH-CBZ dieselben Massenübergänge wie CBZ, nämlich  $m/z$   $237 \rightarrow 194$  und  $m/z$   $237 \rightarrow 179$  (s. Abbildung 57b). Abbildung 57a zeigt, dass in diesen Proben aus geklärtem Abwasser und Oberflächenwasser nahezu dasselbe Verhältnis von 10-OH-CBZ zu CBZ vorlag wie in der Probe aus ungeklärtem Rohabwasser. In der Trinkwasserprobe hingegen war der Peak von 10-OH-CBZ verschwunden, stattdessen lagen zwei weitere Peaks bei niedrigeren Retentionszeiten vor (III und IV). Beide Substanzen zeigten dieselben drei Massenübergänge wie 10-OH-CBZ ( $255 \rightarrow 237$ ,  $237 \rightarrow 194$  und  $237 \rightarrow 179$ ). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass hier Derivate von 10-OH-CBZ vorliegen. Möglicherweise handelt es sich um Konjugate von 10-OH-CBZ, die während der Bodenpassage entstanden sind. Da auch der Übergang  $255 \rightarrow 237$  auftritt, muss es sich um leicht spaltbare Konjugate handeln, die bereits in der Ionenquelle zu 10-OH-CBZ zerfallen können. In Frage kommen hierfür unter anderem Mineralsäureester wie zum Beispiel Sulfate, die auch im menschlichen Organismus nachgewiesen worden sind [81]. Diese Konjugation kann im Boden möglicherweise durch Pilzkulturen stattfinden, die auf ähnliche Weise Pyren zu Pyrenylsulfat metabolisieren [367]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Identität dieser Substanzen nicht geklärt.

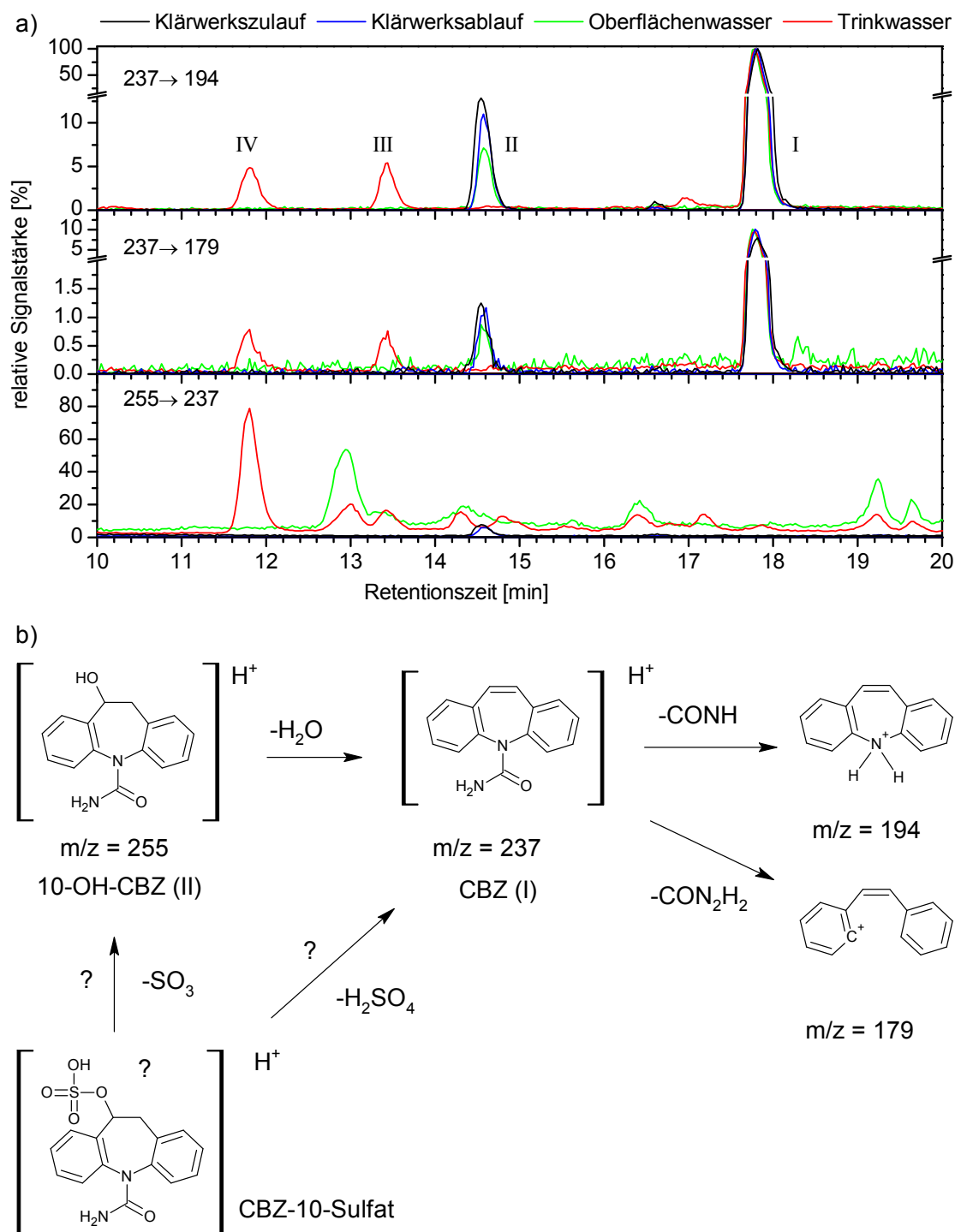


Abbildung 57: a) Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser (Zulauf und Ablauf) wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Die Messwerte der Massenübergänge  $m/z$  237→194, 237→179, und 255→237 wurden mit demselben Faktor normiert, so dass für alle vier Proben der CBZ-Peak im Übergang 237→194 100 % betrug. Oberflächenwasser und Trinkwasser wurden nach SPE-Anreicherung analysiert, Abwasser nach Direkteinspritzung. Peakzuordnung: I CBZ, II 10-OH-CBZ, III & IV unbekannt, möglicherweise CBZ-10-Sulfat  
 b) Hypothese über Ionisation und Zerfall von CBZ, 10-OH-CBZ und CBZ-10-Sulfat im Massenspektrometer.

*DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, , EP-CBZ, Ox-CBZ*

Die mit Sauerstoff funktionalisierten Metaboliten von CBZ zeigen alle den Massenübergang 253→210, der äquivalent zum Übergang  $m/z$  237→194 bei CBZ ist. DiOH-CBZ reagiert hierbei zunächst unter Abspaltung von Wasser zu EP-CBZ [175].

In Klärwerkszulauf und -ablauf sowie in Oberflächenwasser wurden alle erwähnten Metaboliten gefunden (s. Abbildung 58). In diesen drei Matrices war das Verhältnis von Metabolit zu CBZ ähnlich, so dass sich allenfalls von einem geringen Abbau im Klärwerk oder in der Umwelt ausgehen lässt. Auch in Trinkwasser gibt es Indizien für die Präsenz aller Metaboliten, jedoch lässt sich nur bei DiOH-CBZ eine ähnlich hohe Persistenz wie bei CBZ feststellen. Alle übrigen Metaboliten wurden im Vergleich zu CBZ in deutlich geringeren Mengen vorgefunden und waren wie im Fall von EP-CBZ kaum noch nachweisbar. Die Trinkwasserprobe stammte aus dem Versorgungsgebiet des Wasserwerks Tegel, das vorwiegend Uferfiltrat aus der Umgebung des Tegeler Sees zur Trinkwasserherstellung benutzt. Die Reinigungsleistung durch die Bodenpassage ist offenbar nicht ausreichend, um diese Metaboliten zu entfernen. Nach meinem Kenntnisstand ist dies die erste Untersuchung, in der Metaboliten von CBZ im Trinkwasser nachgewiesen wurden.

Darüber hinaus war eine nicht identifizierte Substanz (Peak X) in Abwasser (Zu- und Ablauf) und Oberflächenwasser vorzufinden, die weitgehend dasselbe Massenspektrum zeigte wie 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ (s. Abbildung 59a). Eine naheliegende Erklärung wäre, dass es sich hierbei um den Metaboliten 1-OH-CBZ handelt, der in menschlichem Urin in vergleichbarer Menge wie 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ auftritt (s. Kapitel 2.1.3). In Frage kommt außerdem 4-OH-CBZ, das im menschlichen Metabolismus allerdings nicht in nennenswerter Menge gebildet wird und dessen Auftreten im Abwasser daher unwahrscheinlich ist. Zu beiden Substanzen wurden bislang keine Massenspektren publiziert und sie sind auch nicht kommerziell erhältlich. Es erscheint unwahrscheinlich, dass es sich bei X-OH-CBZ um eine dieser beiden Substanzen handelt, da X-OH-CBZ im Gegensatz zu 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ und Ox-CBZ nicht das Fragmention  $m/z$  208 bildete. Dieses Ion lässt sich auf die Bildung eines Iminochinons zurückführen (s. Abbildung 59b). 2-Iminochinon ist chemisch relativ stabil und lässt sich durch Oxidation mit Hypochlorit aus dem Metaboliten 2-Hydroxyiminostilben synthetisieren [89]. Für die anderen Iminochinone wurden bislang keine Erkenntnisse publiziert. Es erscheint jedoch plausibel, dass bei der Fragmentierung von 1-OH-CBZ und 4-OH-CBZ ähnliche Iminochinone entstehen wie bei der Fragmentierung von 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ und Ox-CBZ. Somit bleibt festzuhalten, dass die Identität von X-OH-CBZ nicht eindeutig geklärt werden konnte.

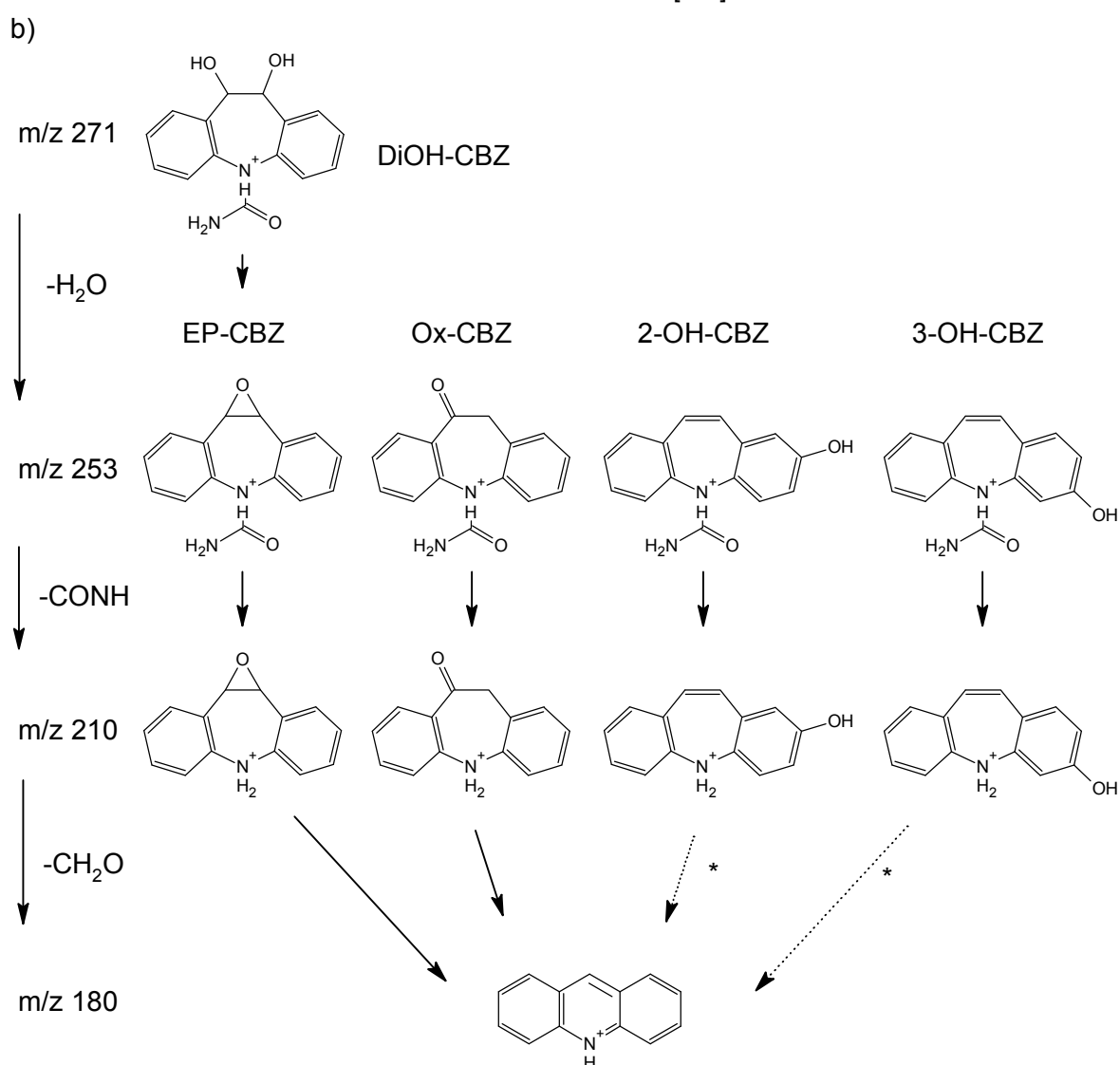
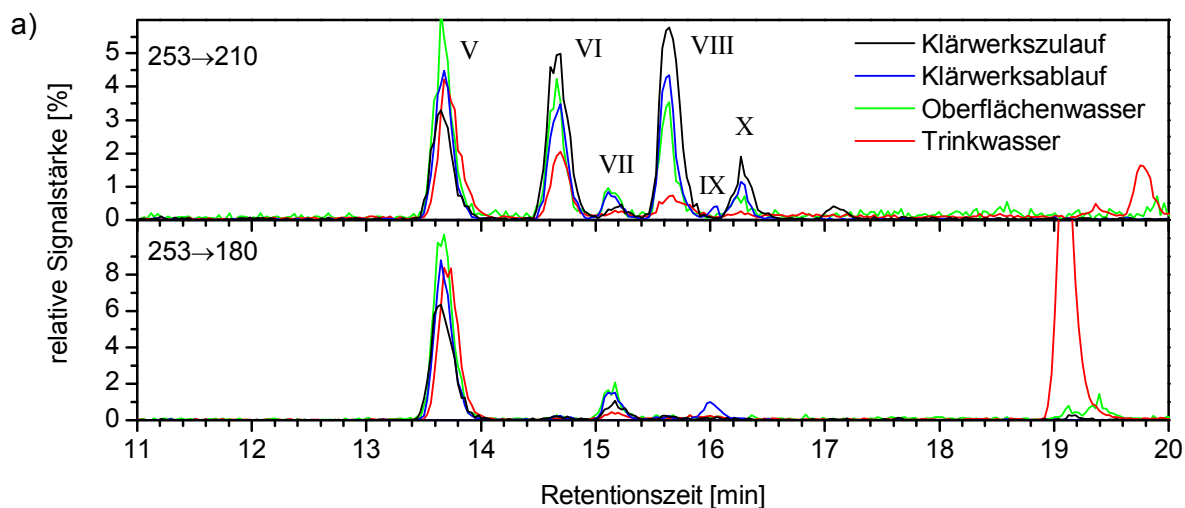


Abbildung 58: a) Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser (Zulauf und Ablauf) wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Die Massenübergänge 253→210 und 253→180 wurden wie in Abbildung 57 normiert. Peakzuordnung: V DiOH-CBZ, VI 2-OH-CBZ, VII EP-CBZ, VIII 3-OH-CBZ, IX Ox-CBZ, X: X-OH-CBZ b) Hypothese über Ionisation und Zerfall von CBZ, EP-CBZ Ox-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZt im Massenspektrometer. Mit \* gekennzeichnete Übergänge finden erst bei sehr hohen Kollisionsenergien statt.



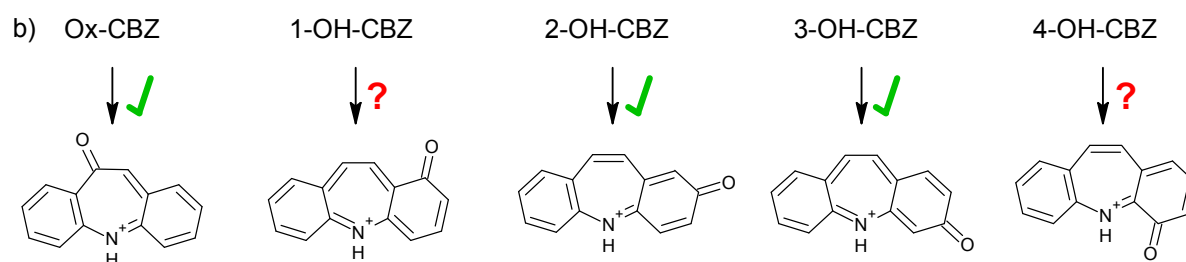
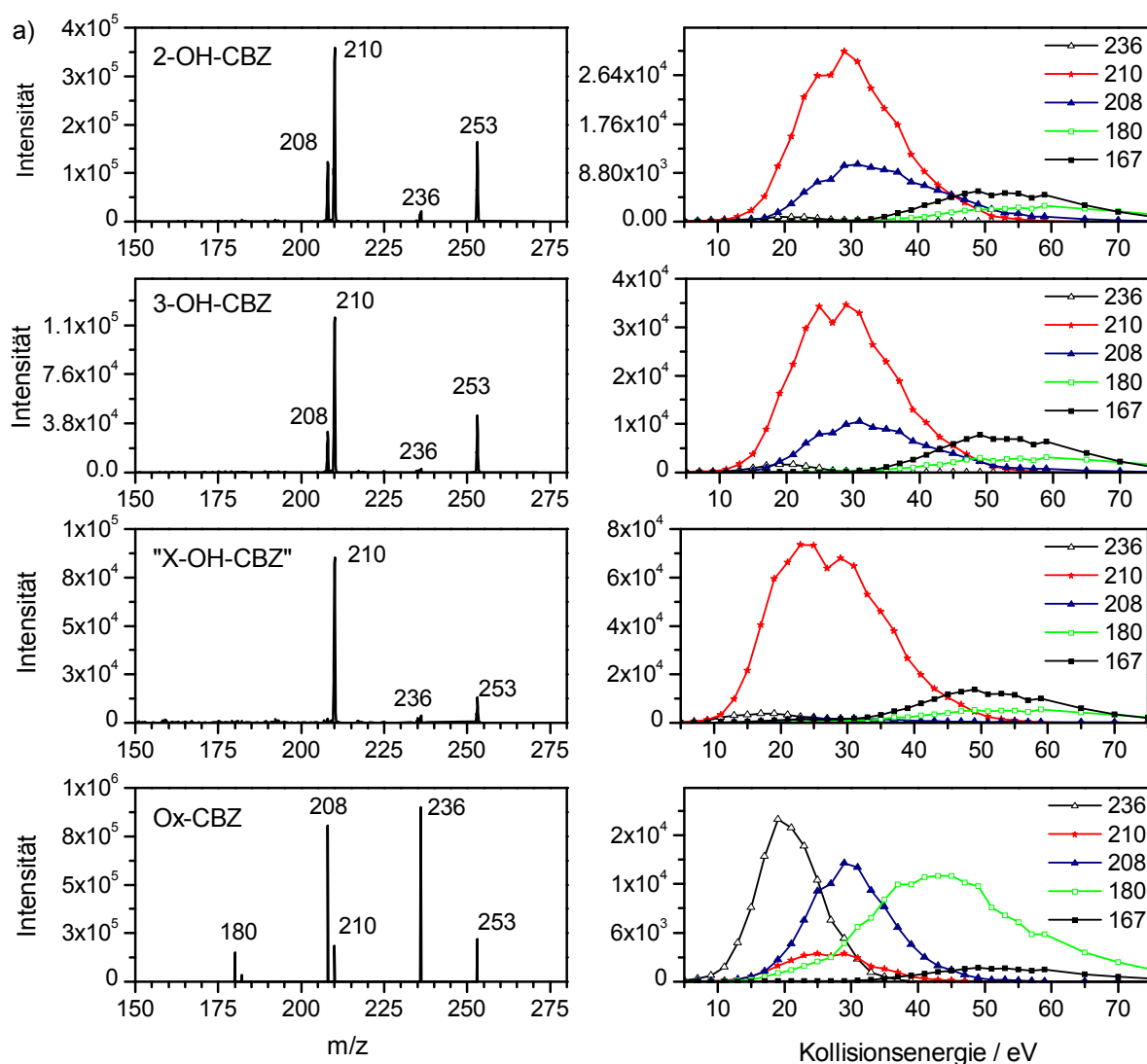


Abbildung 59: a) Links: Massenspektren von 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, X-OH-CBZ und Ox-CBZ (Tochterionenspektren von  $m/z$  253 aus einer Klärwerksablaufprobe, Kollisionsenergie 25 eV). Rechts: Verteilung der Fragment-Ionen in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie. b) Hypothese über die Struktur der gebildeten Iminoquinon-Fragmentionen ( $m/z$  208) nach Verlust von  $\text{CONH}_3$ .

## 4.8.2 Quantitative Untersuchungen

### *Abbau im Klärwerk*

Um ihren Abbau während der Klärwerkspassage zu untersuchen, wurden die CBZ-Metaboliten in den Mischproben aus den fünf Berliner Klärwerken quantifiziert (s. Kapitel 4.7.1). Nur diejenigen Klärwerke wurden betrachtet, bei denen am selben Tag Zulauf und Ablauf beprobt wurden, so dass insgesamt zwölf Proben analysiert wurden.

Für die Metaboliten DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ war im Mittel ein leichter Abbau von 16-27 % zu beobachten (Tabelle 29). Während die Konzentration von 10-OH-CBZ etwa gleich blieb, stieg sie für EP-CBZ in allen Klärwerken an, und zwar durchschnittlich um 32 %. Wie bei CBZ mag auch bei EP-CBZ die Spaltung des N-Glucuronids dafür verantwortlich sein, dass die Konzentration von EP-CBZ während der Klärwerkspassage anstieg (s. Kapitel 2.2.3). Neben CBZ selbst ist EP-CBZ der einzige Metabolit, der als N-Glucuronid ausgeschieden wird. Die übrigen Metaboliten liegen im Urin dagegen vorwiegend als O-Glucuronide vor. Diese Konjugate scheinen bereits vor Erreichen des Klärwerks gespalten zu werden, da im Klärwerkszulauf die Metaboliten unkonjugiert vorgefunden werden und ihre Konzentration während der Abwasserbehandlung auch nicht mehr ansteigt.

Zu beachten ist, dass einige Analyten in ungeklärtem Abwasser einer deutlich höheren Ionensuppression unterliegen als in geklärtem Abwasser (s. Kapitel 4.6.2). Dieser Effekt war für 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ besonders stark ausgeprägt, so dass deren Abbau im Klärwerk tatsächlich höher sein dürfte. Bei einer nachträglichen Korrektur mit Hilfe der in Tabelle 26 angegebenen Wiederfindungsraten ergeben sich für alle Analyten Abbauraten von weniger als 40 %, so dass zusammenfassend von einer hohen Persistenz der Metaboliten gesprochen werden kann. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten aus Kanada und Frankreich, in denen ein sehr geringer oder gar kein Abbau der Metaboliten 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ und 10-OH-CBZ festgestellt wurde (s. Tabelle 6).

*Tabelle 29: Verhältnis aus den Analytkonzentrationen in Klärwerksablauf und Klärwerkszulauf, Mittelwert und Standardabweichung (in Klammern) aus sechs Beprobungen (s. Tabelle 36), alle Messwerte ermittelt mit LC-MS/MS ohne SPE-Anreicherung.*

Substanz	DiOH-CBZ	2-OH-CBZ	10-OH-CBZ	EP-CBZ	3-OH-CBZ	CBZ	Cetirizin
Abbaurate [%]	16 (11)	27 (11)	3 (32)	-32 (13)	27 (13)	-14 (15)	-20 (28)

### *Vorkommen in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser*

Tabelle 30 zeigt, dass die CBZ-Metaboliten auch in Oberflächenwasser und im Fall von DiOH-CBZ auch in Trinkwasser in quantifizierbaren Mengen gefunden wurden. Die Konzentrationen waren aufgrund der Verdünnung deutlich niedriger als in Abwasser.

Interessant ist hierbei die Betrachtung der Metabolitkonzentration im Verhältnis zur Konzentration von CBZ (s. Abbildung 60a). Hier zeigt sich, dass in den meisten Fällen ähnliche Relativkonzentrationen vorliegen. So wurde in allen Proben bis auf den beiden bereits in Kapitel 4.7.1 beschriebenen Ausreißern mehr DiOH-CBZ als CBZ gefunden, die übrigen Metaboliten hingegen wurden in deutlich geringeren Mengen gemessen.

Eine gute Übereinstimmung besteht zwischen den gemessenen Relativkonzentrationen und den beschriebenen Relativkonzentrationen in Urin und Kot (s. Abbildung 60c unten). Dieser hohe Grad der Übereinstimmung war nicht unbedingt zu erwarten, da entscheidende pharmakokinetische Ergebnisse aus einer Studie mit nur zwei Individuen stammten [80]. Nur die relativ hohen Konzentrationen an 10-OH-CBZ in Gewässern stimmten nicht mit den anteiligen Ausscheidungen überein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass 10-OH-CBZ der Hauptmetabolit von Ox-CBZ ist und daher keine Korrelation mit CBZ zu erwarten ist.

Die erhaltenen Relativkonzentrationen lagen für alle Analyten mit Ausnahme von 10-OH-CBZ in etwa auf demselben Niveau wie in anderen Ländern (s. Abbildung 60b). Die Konzentrationen von 10-OH-CBZ waren in Deutschland deutlich höher als in Kanada [158, 175, 178] bzw. deutlich niedriger als in Frankreich [179]. Hieraus lässt sich folgern, dass in Frankreich ein höherer Anteil der Epilepsiepatienten mit Ox-CBZ behandelt wird als in Deutschland.

In Oberflächenwasser enthielten die Proben mit den geringsten CBZ-Konzentrationen (die in Abbildung 60a ganz links erscheinen) einen höheren Anteil an DiOH-CBZ als die Proben mit höherem CBZ-Gehalt. Diese Proben stammten überwiegend aus den östlichen Abschnitten von Teltowkanal und Spree vor der Einleitung von Berliner Abwässern. Wahrscheinlich wurden diese Proben bereits mehrere Tage vor Probennahme im Oberlauf der Spree verunreinigt. In diesem Fall ist möglich, dass bereits biologische oder physikalisch-chemische Abbauprozesse und Bodenadsorptionen stattgefunden haben, die zu diesen Unterschieden geführt haben.

Auffällig war, dass die Konzentrationen der Metaboliten DiOH-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZ relativ zur CBZ-Konzentration im Klärwerksablauf etwas geringer waren als im Klärwerkszulauf und in Oberflächengewässern. Diese Beobachtung sollte nicht verallgemeinert werden, da die meisten Klärwerksablaufproben aus demselben Klärwerk stammten (Waßmannsdorf), die Proben aus Klärwerkszulauf und Oberflächengewässern hingegen aus zahlreichen unterschiedlichen Quellen.

*Tabelle 30: Median-Werte der Stoffkonzentrationen in 100 Wasserproben (s. Abbildung 60). Werte sind absolut in µg/L sowie relativ zur CBZ-Konzentration (CBZ = 100 %) angegeben, Standardabweichung in Klammern. Nur Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze wurden berücksichtigt (<LOQ: unterhalb der Bestimmungsgrenze).*

		CBZ	DiOH-CBZ	2-OH-CBZ	10-OH-CBZ	EP-CBZ	3-OH-CBZ
Trinkwasser (n = 6)	µg/L %	0,10 (0,01) 100	0,16 (0,04) 146 (30)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Oberfl.wasser (n = 52)	µg/L %	0,26 (0,42) 100	0,53 (0,80) 213 (72)	0,024 (0,05) 9 (3)	0,12 (0,17) 22 (12)	0,035 (0,03) 7 (1)	0,019 (0,05) 7 (3)
Klärwerks- ablauf (n = 34)	µg/L %	2,0 (0,5) 100	3,4 (0,8) 174 (32)	0,14 (0,05) 6 (2)	0,50 (0,2) 25 (8)	0,087 (0,03) 4 (1)	0,14 (0,04) 6 (1)
Klärwerks- zulauf (n = 8)	µg/L %	1,9 (1,2) 100	4,0 (0,7) 210 (68)	0,17 (0,04) 10 (2)	0,49 (0,3) 28 (17)	0,059 (0,01) 4 (1)	0,15 (0,05) 9 (2)

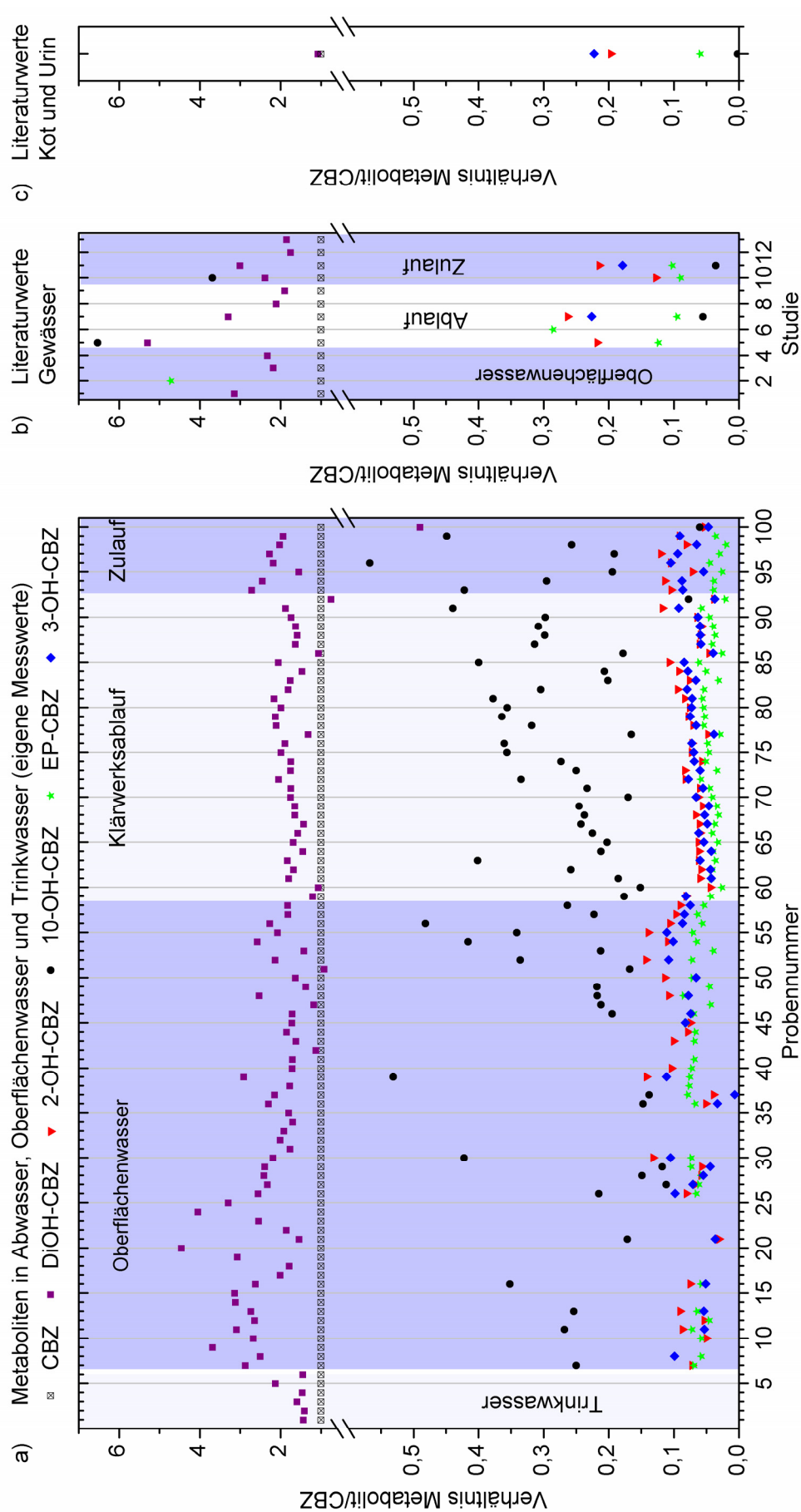


Abbildung 60: a) Die Konzentrationen von CBZ und Metaboliten wurden in 100 Proben mit (SPE)-LC-MS/MS analysiert und in Relation zu CBZ gesetzt (CBZ=1). Die Proben wurden nach Herkunft (Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser (Zu- und Ablauf)) und nach aufsteigender CBZ-Konzentration sortiert. Nur Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze sind dargestellt, für Details zu den Proben siehe Tabelle 35. b) Zum Vergleich die in anderen Ländern gefundenen Stoffkonzentrationen in Gewässern (Literaturrecherche, s. Tabelle 6.). c) Durchschnittliche Konzentrationen der Metaboliten in menschlichen Ausscheidungen (Urin und Kot summiert), s. Tabelle 1.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein kompetitiver ELISA für den Nachweis von CBZ in Abwasser, Oberflächenwasser und Trinkwasser entwickelt und validiert. Die erreichte Bestimmungsgrenze von ca. 30 ng/L ist ausreichend, um CBZ in nahezu allen Abwässern und in vielen Oberflächengewässern zu quantifizieren. Die Methode ist geeignet, um die Einhaltung des gesundheitlichen Orientierungswertes von 300 ng/L im Trinkwasser zu überprüfen.

Der ELISA wurde durch die Untersuchung einer Vielzahl an Proben aus Berliner Abwässern und Oberflächengewässern validiert. Die Übereinstimmung der Analysenergebnisse mit der Referenzmethode HPLC-MS/MS war dabei sehr hoch. Der ELISA zeigte eine exzellente Präzision und erbrachte dabei in allen untersuchten Matrices geringfügig höhere Analysenergebnisse als die Referenzmethode. Die beständige Überbestimmung von etwa 7 % konnte zum größten Teil auf die Präsenz von geringen Mengen des persistenten Metaboliten EP-CBZ zurückgeführt werden.

Die Bindungseigenschaften des verwendeten Antikörpers wurden eingehend untersucht und essentielle Bindungsstellen wurden identifiziert. Zahlreiche strukturell mit CBZ verwandte Stoffe wurden auf ihre Kreuzreaktion mit dem Antikörper untersucht. Einen sehr großen Einfluss auf die Ligandenbindung hatte der Ladungszustand des Kreuzreaktanden. Im Extremfall führte eine Änderung des pH-Wertes zu einer Änderung der Kreuzreaktivität um mehr als das Hundertfache.

Um die Bindung potentiell im Abwasser vorhandener Kreuzreaktanden an den verwendeten Antikörper zu überprüfen, wurde konzentriertes Abwasser flüssigchromatographisch fraktioniert und anschließend im ELISA analysiert. Mit Hilfe hochauflösender MS konnte das Antihistaminikum Cetirizin als Kreuzreaktand identifiziert werden. Der störende Einfluss dieses Kreuzreaktanden auf den CBZ-ELISA konnte nach einer Änderung des pH-Wertes während der Ligandenbindungsreaktion minimiert werden.

Die pH-abhängige Selektivitätssteuerung ermöglichte überdies die Quantifizierung von Cetirizin. Durch die Messung unter sauren und basischen Reaktionsbedingungen konnte mit demselben Antikörper sowohl CBZ als auch Cetirizin quantifiziert werden. Für diesen Dual-Analyt-Immunoassay war der Arbeitsaufwand doppelt so hoch wie bei der Messung eines einzelnen Analyten. Die Präzision der Cetirizin-Bestimmung war bei akzeptabler Richtigkeit deutlich geringer als bei der Bestimmung von CBZ. Mit dieser Methode wurden in der Heuschnupfenzeit zwischen März und August besonders hohe Konzentrationen von Cetirizin in Abwasser und Oberflächenwasser festgestellt. Für CBZ konnte kein vergleichbarer saisonaler Einfluss festgestellt werden.

Zusätzlich wurde mit Hilfe von LC-MS/MS das Auftreten und das Schicksal der Metaboliten von CBZ untersucht. Die Metaboliten EP-CBZ, 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, 10-OH-CBZ und DiOH-CBZ wurden in allen Abwässern und vielen Oberflächengewässern nachgewiesen. DiOH-CBZ erwies sich als ähnlich persistent wie CBZ und konnte in mehreren Trinkwasserproben nachgewiesen werden.

Außerdem wurde ein weiteres bislang nicht identifiziertes Abbauprodukt von CBZ in Abwässern und Oberflächengewässern nachgewiesen. Daneben gibt es Hinweise, dass Konjugate von 10-OH-CBZ im Trinkwasser existieren.

Die Eigenschaften des in dieser Arbeit entwickelten ELISAs machen die Methode interessant für eine Anwendung im Hochdurchsatzscreening. Der Test ist robust und auch für die Verwendung schwierigster Matrices wie zum Beispiel ungeklärter Abwässer geeignet. Da weder Probenvorbereitung noch Probenanreicherung für die Durchführung des ELISAs erforderlich sind, ist er sehr schnell und kostengünstig durchführbar. Das für den Test nötige Probenvolumen ist mit weniger als 1 mL sehr gering.

Wie in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des Berliner Gewässersystems gezeigt werden konnte, ist der ELISA hervorragend geeignet für den Einsatz im Gewässermonitoring.

## 6 Anhang

### 6.1 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Rudolf Schneider (BAM) sehr für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation in seiner Arbeitsgruppe bedanken. Die gemeinsame Begeisterung für die Wasseranalytik und unsere Gespräche haben mich besonders motiviert. Vielen Dank auch für die vielen Freiheiten, durch die sich mein Forscherdrang ungehindert austoben konnte!

Herrn Dr. Michael Weller danke ich für seine Betreuung mit vielen praktischen Tipps. Sein schier unerschöpflicher Einfallsreichtum allen theoretischen und praktischen Problemen gegenüber waren mir eine große Hilfe.

Herrn Prof. Ulrich Panne möchte ich für die Betreuung der Arbeit und seine fortwährende Unterstützung danken.

José Carvalho gilt besonderer Dank für die geteilte Begeisterung für die Untersuchung der Berliner Gewässer und viel Koffein. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht so wie sie ist!

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Andreas Lehmann für die Einführung an der LC-MS/MS und besonders für seine schnelle und kompetente Hilfe bei technischen Problemen bedanken.

Frau Cornelia Brünn danke ich für die Einführung in die ELISA-Technik.

Meinen Mitdoktoranden Astrid Walter, Yvonne Baermann-Stapel, Julia Grandke, Steffen Ramin, Sascha Wagner und Heike Pecher danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Frau Sabine Flemig und Frau Rosemarie Laging sei für die Hilfe bei der Messung der MALDI-TOF-MS-Spektren gedankt.

Kristin Petsch, Nadine Hoffmann, Ulrike Binsker und besonders Denise Thurmann danke ich für ihre allzeit tatkräftige Hilfe im Labor und Unterstützung!

Dr. Jana Falkenhagen danke ich für die Messung der hochauflösenden Massenspektren und ihre Geduld beim Umgang mit kleinsten Probenmengen.

Frau Anka Kohl danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei jederlei Computerproblemen.

Frau Kirsten Pannenbecker danke ich für die Messung der Trinkwasserproben und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Praktikanten Franziska Finn und Tom Neugut danke ich für ihr Engagement und den wissenschaftlichen Beitrag zu dieser Arbeit.

Dr. Vânia Calisto danke ich für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Bei Herrn Dr. Uwe Dünnbier möchte ich mich für seine Unterstützung und die vielen Kontakte bedanken, die für mich beim Beschaffen der Wasserproben sehr hilfreich waren.

Vielen Dank an die Mitarbeiter der Labors der Berliner Wasserbetriebe und an die Mitarbeiter der Wasserschutzpolizei für die Hilfe beim Probensammeln.

Meinem ehemaligen Chemielehrer Josef Oevermann möchte ich für die anschauliche und begeisternde Vermittlung der Chemie danken. Ohne seinen initialen Beitrag wäre diese Arbeit niemals entstanden.

Großer Dank gilt meinem Bruder Ferdinand für die Durchsicht der Arbeit und seine hilfreichen Kommentare.

Mein größter Dank gilt Dagmar Schütt, die mich nicht nur bei dieser Arbeit bis zum Gehtnichtmehr und darüber hinaus unterstützt.



## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

10-OH-CBZ	10,11-Dihydro-10-hydroxycarbamazepin
1-OH-CBZ	1-Hydroxycarbamazepin
2-OH-CBZ	2-Hydroxycarbamazepin
3-OH-CBZ	3-Hydroxycarbamazepin
4-OH-CBZ	4-Hydroxycarbamazepin
AK	Antikörper
a.u.	Beliebige Einheiten (arbitrary units)
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (atmospheric pressure chemical ionisation)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BWB	Berliner Wasserbetriebe
CBZ	Carbamazepin
CE	Kollisionsenergie (collision energy)
CR	Kreuzreaktivität (cross reactivity)
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	Dicyclohexylharnstoff (dicyclohexylurea)
DiH-CBZ	10,11-Dihydrocarbamazepin
DiOH-CBZ	10,11-Dihydro-trans-10,11-dihydroxycarbamazepin
DMF	N,N-Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP-CBZ	10,11-Epoxycarbamazepin
ESI	Electrospray Ionisation
EU	Europäische Union
GC	Gaschromatographie
HCA	9-Hydroxymethyl-10-carbamoylacridan
HOW	Havel-Oder-Wasserstraße
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantitation)
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization
Max.	Maximum
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
n. b.	nicht bestimmt
n. g.	nicht getestet
OD	Optische Dichte
Oberfl.wasser	Oberflächenwasser

Ox-CBZ	Oxcarbazepin
p.a.	pro analysi (für die Analyse bestimmt)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered solution)
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,05 % Tween20
Ref.	Referenz
RSD	Relative Standardabweichung (relative standard deviation)
RT	Raumtemperatur
SOW	Spree-Oder-Wasserstraße
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
THF	Tetrahydrofuran
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TOF	Flugzeit (time of flight)
TRC	Toronto Research Chemicals
UHW	Untere Havel-Wasserstraße
WW	Abwasser (wastewater)
WWTP	Kläwerk (wastewater treatment plant)

## 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von CBZ.....	4
Abbildung 2: links: Verordnungszahlen von CBZ und Ox-CBZ in Deutschland in Millionen Tagesdosen von 1986 2010; ab 1991 einschließlich der neuen Bundesländer [60-63]; rechts: Verkaufsmengen und mittlerer Pro-Kopf-Jahresverbrauch von CBZ in ausgewählten Ländern 2004 [64], zitiert nach [34]. ....	4
Abbildung 3: Kristallstruktur von Carbamazepin und Veranschaulichung des Biegungswinkels $\alpha$ , des Anellierungswinkels $\beta$ , des Torsionswinkels $\gamma$ (C11a-C4a-C5a-C9a) und des Abstands $\delta$ zwischen den beiden Schwerpunkten der Phenyleinheiten. Abbildungen entnommen aus [70]. ....	5
Abbildung 4: Abbau von CBZ im menschlichen Körper.....	6
Abbildung 5: Zusammensetzung der CBZ-Metaboliten in Urin und Kot. Mit Ausnahme von CBZ-N-Glucuronid sind die Konjugate nicht gesondert aufgeführt, sondern mit der Ursprungssubstanz zusammengefasst.....	7
Abbildung 6: Lage der Gewässer und Klärwerke in Berlin. Die eingezeichneten Fließrichtungen und mittleren Flussraten wurden für den Sommer 2003 bestimmt [140]. Nicht eingezeichnet sind die Wasserentnahmen durch Grundwasseranreicherung und Uferfiltration.....	13
Abbildung 7: Schematischer Ablauf des kompetitiven ELISAs in fünf Schritten. Die Wände der Mikrotiterplatte sind als dunkelgrauer Kasten dargestellt. Zwischen jedem Schritt wird der Überstand entfernt und die Kavität mehrfach gespült.....	24
Abbildung 8: Kalibrierkurve eines ELISAs mit Veranschaulichung der vier Parameter der sigmoidalen Kalibrierfunktion nach Rodbard.....	25
Abbildung 9: Form und Lage des Präzisionsprofils bei simulierter Standardabweichung der Absorption als Summe aus absoluter Standardabweichung $s_{absolut}$ und Standardabweichung relativ zur OD ( $s_{relativ}$ ). a) bei einem absoluten Fehler von 0,002 und relativem Fehler von 1 %, 3 %, 5 %; b) bei einem relativen Fehler von 3 % und absolutem Fehler von 0,001; 0,002 und 0,004. Die zugehörige Kalibrierkurve ist grau dargestellt, mit A = 1; B = 1; C = 0,1 und D = 0.....	28
Abbildung 10: Optische Dichte (405 nm) der Fraktionen nach gelchromatographischer Fraktionierung des Tracers CBZ-Gly3-HRP 1. Die Fraktionen mit einer OD oberhalb von 0,1 (rot markiert) wurden gesammelt und vereinigt. ....	39
Abbildung 11: Bestimmung der Kopplungsdichte anhand des UV/VIS-Spektrums; oben: Die Spektren von HRP und dem Hapten CBZ-Gly3 wurden bei exakt gleicher molarer Konzentration gemessen. Die Spektren der	

Enzymkonjugate wurden bei ähnlicher molarer Konzentration gemessen und bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ an das HRP-Spektrum angeglichen; unten: Die Differenz aus dem Spektrum von Konjugat und ungekoppeltem Enzym wurde gebildet und in Relation zum Spektrum des Haptens gesetzt. ....	40
Abbildung 12: Reihenfolge, in der die Kavitäten beim Pipettieren von Antikörper, Tracerlösung, Substrat und Stopplösung befüllt wurden. Mit einer Multipette wurde beginnend bei A1 zunächst die gesamte Spalte befüllt und sodann mit der benachbarten Spalte fortgefahren. ....	44
Abbildung 13: Je $700 \mu\text{L}$ der Proben und Kalibrierlösungen wurden zunächst in eine DeepWell-Platte vorpipettiert. Mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette wurden je drei Replikate à $200 \mu\text{L}$ aus den vorpipettierten Spalten in die vorbereitete ELISA-Platte übertragen. Die drei Replikate wurden dabei gleichmäßig über die Plattenbreite verteilt. ....	44
Abbildung 14: Verteilung der Proben 1-24 und der Kalibrierlösungen K1-K8 auf einer 96-well-Mikrotiterplatte. Diese Verteilung ist geeignet, bei einer Plattendrift die Richtigkeit zu erhöhen. Aus 32 vorpipettierten Wells einer Reservoir-Platte lassen sich die Lösungen mit einer 8-Kanal-Pipette schnell und mit geringer Fehlerquote auf die ELISA-Platte übertragen. ....	45
Abbildung 15: Chromatogramme zu allen untersuchten MRM-Spuren; fett gedruckt der jeweilige Peak der links genannten Substanz; Kalibrierlösungen in Reinstwasser bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g/L}$ ....	49
Abbildung 16: Tracersynthese ohne Spacer. ....	52
Abbildung 17: ELISA-Kalibrierkurven bei Verwendung der Tracer CBZ-HRP und CBZ-Gly3-HRP 1. Durchführung des ELISAs auf derselben Platte bei pH 7,6; ELISA-Methode A wurde leicht abgewandelt: a) $c(\text{prim. AK}) = 2,3 \text{ nmol/L}$ , $c(\text{Tracer}) = 24 \text{ nmol/L}$ ; A = 0,11; B = 0,94; C = 0,19; D = 0,084. b) $c(\text{prim. AK}) = 0,45 \text{ nmol/L}$ , $c(\text{Tracer}) = 1,7 \text{ nmol/L}$ ; A = 0,83; B = 1,01; C = 0,16; D = 0,079. ....	53
Abbildung 18: Synthese des Haptens. ....	53
Abbildung 19: Aktivierung des Haptens zum NHS-Ester (R: s. Abbildung 18). ....	54
Abbildung 20: Reaktion des NHS-Esters mit Meerrettichperoxidase (R: s. Abbildung 18). ....	54
Abbildung 21: MALDI-TOF-MS-Spektrum von ungekoppelter HRP und dem Konjugat CBZ-Gly3-HRP 5. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 11 bzw. 13 Einzelspektren. Peakzuordnung: I:[M-H] <sup>3+</sup> ; II:[M-H] <sup>2+</sup> ; III:[M2-H] <sup>3+</sup> ; IV:[M-H] <sup>+</sup> ; V:[M3-H] <sup>2+</sup> ; VI:[M2-H] <sup>+</sup> ; VII:[M5-H] <sup>2+</sup> ; VIII:[M3-H] <sup>+</sup> ....	55
Abbildung 22: a) UV/VIS-Spektren von ungekoppelter HRP, verschiedener Enzymkonjugate und dem Hapten CBZ-Gly3. Spektren von CBZ-Gly3 und HRP wurden bei identischer Konzentration aufgenommen ( $21,8 \mu\text{mol/L}$ ), die Enzymkonjugate wurden annähernd auf diese Konzentration verdünnt, die erhaltenen Spektren wurden anschließend anhand der Soret-Bande bei $405 \text{ nm}$ an die HRP-Kurve angepasst. b) Spektren der Enzymkonjugate nach Differenzbildung mit dem Spektrum von ungekoppelter HRP, zum Vergleich mit dem Spektrum von CBZ-Gly3. Bestimmung der Kopplungsdichte anhand des Verhältnisses der Absorptionen von Enzymkonjugat und Hapten bei $285 \text{ nm}$ . ....	57
Abbildung 23: Inkubationszeit und Konzentration des sekundären Antikörpers wurden im ELISA variiert (Methode A bei pH 7,6), Skalierung der OD in Prozent des Maximalwertes. ....	63
Abbildung 24: a) Checkerboard-Verfahren: Im ELISA wurden Antikörper und Tracer sequentiell entlang der beiden Plattendimensionen verdünnt. Die Intensität der blauen Farbe entspricht der gemessenen Signalthöhe. b) In einem weiteren Experiment wurden zu den markierten Kombinationen Testmittelpunkt (C-Wert) und das Signal des Blindwertes (A-Wert) bestimmt und gegen das Verhältnis der molaren Konzentrationen von Tracer und Antikörper aufgetragen (ELISA bei pH 7,6; Inkubationszeit des Substrats: 30 Sekunden; Konzentrationsangaben beziehen sich auf das gesamte Reaktionsvolumen; die Konzentration des Antikörpers bezieht sich auf die Konzentration in Lösung während der Beschichtung). ....	64
Abbildung 25: Wie in Abbildung 24 wurden im ELISA die Konzentrationen von Antikörper und Tracer variiert, wobei für jeden Datensatz das Produkt aus beiden Konzentrationen (in $\text{nmol}^2 \text{L}^{-2}$ ) konstant gehalten wurde. ....	65
Abbildung 26: Ausgehend vom voroptimierten Koffein-ELISA wurden Experimente mit variierendem Verhältnis von Tracer und Antikörper durchgeführt. Der Graph zeigt die Abhängigkeit der Signalthöhe (A-Wert) und des Testmittelpunkts (C-Wert) vom Quotienten aus molarer Tracer- und Antikörperkonzentration. Das Produkt aus den Konzentrationen von Tracer und Antikörper betrug $0,014 \text{ nmol}^2/\text{L}^2$ ....	67

Abbildung 27: Kalibrierkurven des CBZ-ELISAs bei verschiedenen zeitlichen Abständen der Tracer- und Probenaufragung: 100 µL Tracer- und 100 µL Kalibrierlösung wurden im zeitlichen Abstand von 0-30 Minuten auf die Platte aufgetragen, die Gesamtinkubationszeit betrug in allen Fällen 60 Minuten (ELISA Methode A bei pH 7,6).	68
Abbildung 28: Einfluss des Kochsalzgehalts während der Ligandenbindungsreaktion auf das Signal und den Testmittelpunkt des ELISAs. Reaktion wurde in 0,003 M Glycinpuffer bei pH 9,5 durchgeführt.	69
Abbildung 29: Einfluss des Volumenanteils von Methanol und Acetonitril in einer Probe auf die obere (A) und untere (D) Asymptote sowie den Wendepunkt der Kalibrierkurve des CBZ-ELISAs; ELISA wurde bei pH 7,6 durchgeführt (ELISA Methode A).	69
Abbildung 30: Simulierte Wiederfindungsrate von Lösungsmittelhaltigen Standardlösungen bezogen auf lösungsmittelfreie Kalibrierlösungen, in Abhängigkeit von der Analytkonzentration.	70
Abbildung 31: ELISA-Platten wurden nach Beschichtung mit sekundärem und primärem Antikörper konserviert und bei 4°C 2-12 Wochen gelagert. Danach wurde die Signalstärke (a) und die Homogenität innerhalb der 96 Kavitäten bestimmt (b) und mit einer frisch beschichteten Platte verglichen.	72
Abbildung 32: Strukturen von Stoffen, die auf ihre Kreuzreaktivität im CBZ-ELISA untersucht wurden. Zur Nummerierung siehe Tabelle 19.	74
Abbildung 33: Eine 4000-fach konzentrierte Abwasserprobe wurde analysiert mit LC-DAD UV (a), LC MS/MS im MRM Modus (b), LC-ELISA bei pH 4,5 und pH 10,5 (c). Die Graphen wurden relativ zum höchsten Peak skaliert. Die gestrichelte Linie in Abbildung a) stellt das Chromatogramm von Reinstwasser dar. Die Peaks konnten folgendermaßen zugeordnet werden: DiOH-CBZ (I), 2-OH-CBZ (II), 10-OH-CBZ (III), EP-CBZ (IV), 3-OH-CBZ (V), CBZ (VII) und Cetirizin (VIII). Peak VI konnte nicht zugeordnet werden.	76
Abbildung 34: Peak VIII (s. Abbildung 33) wurde gesammelt und unter geänderten chromatographischen Bedingungen analysiert. LC-DAD UV (a) und LC-ELISA (b) sind abgebildet. Die grau unterlegte Fraktion wurde mit hochauflösender MS weitergehend analysiert.	77
Abbildung 35: Kalibrierkurven von CBZ und Cetirizin wurden bei acht verschiedenen pH-Werten bestimmt. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Signalstärke (a) und der Testmittelpunkte (b) vom pH-Wert. Beide Abbildungen zeigen jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Experimenten.	77
Abbildung 36:a) Normierter, reziproker IC <sub>50</sub> -Wert von Cetirizin und Molenbrüche der Spezies in Abhängigkeit vom pH-Wert des Probenpuffers (Spezies I: Dikation; II:Kation; III: Zwitter-Ion; IV: Anion; Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Experimenten); b) Struktur von Cetirizin (Spezies III) mit pK <sub>a</sub> -Werten.	78
Abbildung 37: Abhängigkeit der Kreuzreaktivität vom pH-Wert des Probenpuffers. a) Verbindungen ohne Polaritätswechsel im dargestellten pH-Bereich; b) Verbindungen mit Polaritätswechsel. Die jeweiligen pK <sub>a</sub> -Werte sind mit einem roten Pfeil markiert. Werte wurden je einmal gemessen.	79
Abbildung 38: Überlagerung der Kristallstrukturen von Norchlorcyclizin (grün) und CBZ (rot).	80
Abbildung 39: Strukturen einiger Kreuzreaktanden mit Angabe der Kreuzreaktivitäten. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Werte bei pH 7,6 (mit BSA-Zugabe) ermittelt. In Klammern befindet sich die Nummerierung wie in Tabelle 19.	83
Abbildung 40: Zusammenfassende Beschreibung der Strukturmerkmale, die für die Ligandenbindung von Bedeutung sind.	85
Abbildung 41: Chlorphenamin	85
Abbildung 42: Messwerte von ELISAs bei Benutzung einer Einkanal-Multipette (a) und der 96-Kanal-Pipettierstation Liquidator96 (b) mit Angabe der relativen Standardabweichung (Mittelwert und Standardabweichung von n Platten). Alle 96 Kavitäten wurden mit Reinstwasser statt Proben befüllt. Beispielhaft ist die Intensitätsverteilung anhand jeweils einer Platte dargestellt, die Intensität der Graustufen entspricht dabei der Höhe der Messwerte.	89
Abbildung 43: a) Die CBZ-Konzentration in Proben aus Oberflächengewässern und Klärwerken (Zu- und Ablauf) wurde mit ELISA (Methode B, pH 10,5) und LC-MS/MS bestimmt. Der Graph zeigt die Korrelation beider Methoden sowie die errechnete Regressionsgerade. b) Proben aus Oberflächenwasser und Abwasser wurden	

mit dem ELISA unter Verwendung von vier verschiedenen Probenpuffern bei pH 4,5, bei pH 7,6 mit 1 % BSA, bei pH 9,5 und bei pH 10,5 gemessen. Die gemessene CBZ-Konzentration wurde ins Verhältnis zum Ergebnisse von LC-MS/MS gesetzt (n Proben). Die Kästen beschreiben den Wertebereich von 10-90 %, der Querbalken den Median, das Quadrat den Mittelwert und die Kreuze die Extremwerte.....	92
Abbildung 44: Kalibrierkurve mit Präzisionsprofil (gepunktete Linie) des CBZ ELISAs (Methode B, pH 10,5, Pipettierschema B, Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Replikaten). ....	93
Abbildung 45: Kalibrierkurven von CBZ und Cetirizin bei pH 4,5 (a) und pH 10,5 (b). Mittelwert und Standardabweichung (n = 2). Errechnete Parameter der Kalibrierfunktion: a) CBZ: A = 1,05; B = 0,964; C = 0,180; D = 0,034; Cetirizin: A = 1,01; B = 1,03; C = 0,091; D = 0,041; b) CBZ: A = 0,607; B = 0,998; C = 0,202; D = 0,045; Cetirizin: A = 0,576; B = 1,05; C = 2,46; D = 0,041. ....	94
Abbildung 46: Die Äquivalentkonzentrationen cELISA der Cetirizin-Kalibrierlösungen aus Abbildung 45 wurden mit Hilfe der CBZ-Kalibrierkurve berechnet. Das Verhältnis cELISA/cCetirizin wurde gegen die Cetirizin-Konzentration aufgetragen. Die Kreuzreaktivität (CR) ergibt sich als mittleres Verhältnis cELISA/cCetirizin derjenigen Punkte, die sich innerhalb des Quantifizierungsbereichs der CBZ-Kalibrierkurve befinden. ....	95
Abbildung 47: Die Cetirizin-Konzentration in 85 Proben aus Oberflächengewässern und Klärwerken (Zu- und Ablauf) wurde mit ELISA und LC-MS/MS bestimmt. Der Graph zeigt die Korrelation beider Methoden sowie die errechnete Regressionsgerade. ....	97
Abbildung 48: Vergleich der chromatographischen Trennungen einer Probe aus dem Klärwerksablauf von Klärwerk Waßmannsdorf mit vier verschiedenen Kombinationen aus Säule und Laufmittel. Messung des Massenübergangs (MRM) 253→210 mit LC-MS/MS. Substanzzuordnung: I DiOH-CBZ, II 2-OH-CBZ, III unbekannt, IV EP-CBZ, V 3-OH-CBZ, VI Ox-CBZ, VII „X-OH-CBZ“ .....	99
Abbildung 49: Die Abhängigkeit des Responsefaktors von der Konzentration ist dargestellt (Mittelwert aus zwei Messungen). Die Korrektur durch den internen Standard ist hier nicht berücksichtigt. ....	100
Abbildung 50: Der Gehalt an CBZ und Cetirizin wurde in sechs Berliner Klärwerken im Jahr 2010 mit ELISA (n = 2) und LC-MS/MS (n = 1 oder 2) bestimmt. Siehe auch Tabelle 36. Mit Sternchen versehene Proben wurden nicht gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus n Messungen. Die per ELISA bestimmten Cetirizin-Konzentrationen wurden aus zwei Messungen bei pH 4,5 und pH 10,5 berechnet, die zugehörige Standardabweichung wurde nach der Gaußschen Fehlerfortpflanzung errechnet.....	104
Abbildung 51: Aus dem Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf wurden 2h-Mischproben (a), 24h-Mischproben (b) und Schöpfproben (c) entnommen. In den Proben wurden per ELISA (n = 2 oder 3) Cetirizin und CBZ bestimmt, weitere Analyten wurden zudem in einigen Proben mit LC-MS/MS (n = 1) quantifiziert. Zu den Ergebnissen von ELISA und LC-MS/MS siehe auch Tabelle 32, Tabelle 33 und Tabelle 37. ....	106
Abbildung 52: Am 1.10.2008 und 28.2.2009 wurden Schöpfproben vom Ufer des Teltowkanals genommen und die Konzentration von CBZ bestimmt (ELISA, pH 7,6). Am 1.10.2008 wurde außerdem der pH-Wert gemessen. Bei km 32,2 und 34,7 befinden sich die beiden Abläufe des Klärwerks Waßmannsdorf; Quelle der Niederschlagsinformationen: Deutscher Wetterdienst, Station Berlin-Tempelhof. ....	108
Abbildung 53: Zwischen November 2009 bis August 2010 wurden an zwei Stellen Proben aus dem Teltowkanal entnommen und mit ELISA und LC-MS/MS analysiert. Messwerte unterhalb der Bestimmungsgrenze sind als Stern auf halber Höhe der Nachweisgrenze eingetragen. Zu den Messwerten siehe auch Tabelle 32 (ELISA) und Tabelle 33 (LC-MS/MS). ....	109
Abbildung 54: Verbreitung von CBZ im Berliner Stadtgebiet. Proben wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren (Juli 2008-Juli 2010) gesammelt und mittels ELISA gemessen. a) Messwerte ohne August 2008 und Juli 2010, b) Messwerte aus August 2008 und Juli 2010 (Werte in Klammern: mittlere Abflussrate in 2006 [140]). Siehe auch Tabelle 39. ....	112
Abbildung 55: Links: Die CBZ-Konzentration von 179 Trinkwasserproben aus dem Rohrnetz der Berliner Wasserbetriebe wurde im Januar 2010 mittels ELISA bestimmt, siehe auch Tabelle 38. Rechts: Verteilungsmöglichkeiten für Trinkwasser im Berliner Stadtgebiet (Bildquelle: BWB [140]). ....	113
Abbildung 56: Oben: Verhältnis der Konzentrationen (m/v) Cetirizin/CBZ im Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf (Quadrate) und im Teltowkanal bei km 34,4 (Kreise), mit gleitendem Durchschnitt aus fünf benachbarten	

Punkten. Unten: Häufigkeit von mittleren und hohen Pollenkonzentrationen in Zehntagesperioden in Pollenfallen in und um Berlin. ....	114
Abbildung 57: a) Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser (Zulauf und Ablauf) wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Die Messwerte der Massenübergänge $m/z$ 237→194, 237→179, und 255→237 wurden mit demselben Faktor normiert, so dass für alle vier Proben der CBZ-Peak im Übergang 237→194 100 % betrug. Oberflächenwasser und Trinkwasser wurden nach SPE-Anreicherung analysiert, Abwasser nach Direkteinspritzung. Peakzuordnung: I CBZ, II 10-OH-CBZ, III & IV unbekannt, möglicherweise CBZ-10-Sulfat b) Hypothese über Ionisation und Zerfall von CBZ, 10-OH-CBZ und CBZ-10-Sulfat im Massenspektrometer. ....	116
Abbildung 58: a) Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser (Zulauf und Ablauf) wurden mittels LC-MS/MS analysiert. Die Massenübergänge 253→210 und 253→180 wurden wie in Abbildung 57 normiert. Peakzuordnung: V DiOH-CBZ, VI 2-OH-CBZ, VII EP-CBZ, VIII 3-OH-CBZ, IX Ox-CBZ, X: X-OH-CBZ b) Hypothese über Ionisation und Zerfall von CBZ, EP-CBZ Ox-CBZ, 2-OH-CBZ und 3-OH-CBZt im Massenspektrometer. Mit * gekennzeichnete Übergänge finden erst bei sehr hohen Kollisionsenergien statt. ...	118
Abbildung 59: a) Links: Massenspektren von 2-OH-CBZ, 3-OH-CBZ, X-OH-CBZ und Ox-CBZ (Tochterionenspektren von $m/z$ 253 aus einer Klärwerksablaufprobe, Kollisionsenergie 25 eV). Rechts: Verteilung der Fragment ionen in Abhängigkeit von der Kollisionsenergie. b) Hypothese über die Struktur der gebildeten Iminochinon-Fragmentionen ( $m/z$ 208) nach Verlust von CONH <sub>3</sub> . ....	119
Abbildung 60: a) Die Konzentrationen von CBZ und Metaboliten wurden in 100 Proben mit (SPE)-LC-MS/MS analysiert und in Relation zu CBZ gesetzt (CBZ=1). Die Proben wurden nach Herkunft (Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser (Zu- und Ablauf)) und nach aufsteigender CBZ-Konzentration sortiert. Nur Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze sind dargestellt, für Details zu den Proben siehe Tabelle 35. b) Zum Vergleich die in anderen Ländern gefundenen Stoffkonzentrationen in Gewässern (Literaturrecherche, s. Tabelle 6.). c) Durchschnittliche Konzentrationen der Metaboliten in menschlichen Ausscheidungen (Urin und Kot summiert), s. Tabelle 1. ....	122
Abbildung 61: Reinheitsüberprüfung von CBZ-Triglycin mittels LC-DAD-UV, die untere Kurve stellt eine Vergrößerung dar. ....	137
Abbildung 62: Kanalsystem zur Ableitung von Regenwasser im Südosten Berlins. Quelle: Berliner Senatsverwaltung [368]. ....	138

## 6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Metaboliten von CBZ und ihr Vorkommen in Urin, Anteile als Mittelwert aller Messwerte, in Klammern Spannweite der Werte. ....	8
Tabelle 2: Anthropogene Marker. ....	9
Tabelle 3: Vorkommen von CBZ in Oberflächenwasser und Abwasser. Angegeben sind der Median (Med.) und die Höchstkonzentration (Max.) aller untersuchten Studien in ng/L sowie die Gesamtzahl aller Proben n (k.A.: keine Angabe, >: mehr als). Die Anzahl der betrachteten Studien steht in Klammern (s. Tabelle 31 im Anhang). 11	
Tabelle 4: Literaturübersicht über CBZ-Konzentrationen im Zulauf und Ablauf der Berliner Klärwerke, n bezeichnet die Anzahl der Stichproben. ....	14
Tabelle 5: CBZ-Konzentrationen [ $\mu\text{g/L}$ ] in ausgewählten Oberflächengewässern in den Jahren 2000 bis 2003 [133, 146], n bezeichnet die Anzahl der Stichproben. ....	15
Tabelle 6: Konzentrationen von CBZ und Metaboliten in Abwässern. Mittelwerte aus n Messwerten, alle Angaben in $\mu\text{g/L}$ . Nur Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze wurden herangezogen. ....	18
Tabelle 7: Auflistung einiger ELISAs, die für die Detektion von organischen Kontaminanten in Gewässern geeignet sind, k.A.: keine Angabe (kommerzielle Kits), SPE: Festphasenextraktion. ....	23
Tabelle 8: Zusammensetzung und pH-Wert der verwendeten Puffer. ....	34

Tabelle 9: Massenspektrometrische Analyse des gereinigten Haptens CBZ-Triglycin im Full Scan Modus (positive und negative Ionisierung) und Product Ion Scan Modus (positive Ionisierung, Kollisionsenergie 30 eV).....	37
Tabelle 10: Herstellung der Tracer CBZ-Gly3-HRP 2-4. ....	38
Tabelle 11: MS/MS Parameter für die Quantifizierung verschiedener Analyten in Gewässern; weitere Parameter: Collision gas: 41 kPa; curtain gas: 172 kPa; ion source gas #1: 345 kPa; ion source gas #2: 414 kPa; source temperature: 400°C; entrance potential: 10 V; declustering potential: 60 V; ion spray voltage: 4,5 kV; dwell time: 100 ms (alle Übergänge).....	48
Tabelle 12: Mit MALDI-TOF-MS bestimmte Massen der Proteinkonjugate aus Meerrettichperoxidase und CBZ. Die HRP-Referenzmessung wurde am selben Tag unter gleichen Messbedingungen anhand von ungekoppelter Peroxidase durchgeführt. Die Kopplungsdichte ergibt sich aus der Differenz der Masse des Konjugats und der HRP-Referenz, geteilt durch die Haptenmasse.....	56
Tabelle 13: Kopplungsdichten der Enzymkonjugate, bestimmt anhand der UV-Absorption bei 285nm. ....	58
Tabelle 14: Ergiebigkeit der Tracer wurde unter gleichen Bedingungen und bei ähnlicher OD (0,4-0,8) im ELISA gemessen; Werte sind relativ zur höchsten Ergiebigkeit; Ergiebigkeit von CBZ-HRP war sehr klein und konnte nur bei erhöhter Konzentration des primären Antikörpers abgeschätzt werden. ....	59
Tabelle 15: Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten im ELISA. ....	60
Tabelle 16: Optimierte Parameter und ihr Einfluss auf Sensitivität, Signalstärke und Kosten des ELISAs. ....	61
Tabelle 17: Übersicht der untersuchten sekundären Antikörper. ....	62
Tabelle 18: Zwei verschiedene CBZ-spezifische Antikörper wurden im ELISA verglichen (eine Platte; Methode A bei pH 7,6; Tracer: CBZ-Gly3-HRP 4).....	64
Tabelle 19: Molare Kreuzreaktivitäten bei vier verschiedenen pH-Werten. Mittelwerte und absolute Standardabweichungen, Anzahl der Messungen in Klammern angegeben. Lewis-Formeln zu allen Verbindungen: siehe Abbildung 32; pKa-Werte ohne Referenz wurden per Software berechnet (ACD Labs).....	75
Tabelle 20: Anhand der Kristallstrukturen wurden der Biegungswinkel $\alpha$ der Anellierungswinkel $\beta$ der Torsionswinkel $\gamma$ sowie der Abstand der Phenylringe $\delta$ bestimmt. Soweit mehrere Konformere pro Elementarzelle vorhanden sind, sind diese getrennt nebeneinander aufgeführt. Von einigen Substanzen war nur die Kristallstruktur eines Salzes (z. B. eines Pikrats) bekannt. ....	81
Tabelle 21: Anzahl der von den gesetzlichen Krankenkassen in Deutschland 2009 verschriebenen definierten Tagesdosen (DDD) [54], die Höhe der empfohlenen Tagesdosen [52], die aus diesen Daten resultierende insgesamt verbrauchte Menge sowie die spezifische (massenbezogene) Kreuzreaktivität CR bei pH 10,5 für ausgewählte Wirkstoffe mit struktureller Ähnlichkeit zu CBZ. ....	86
Tabelle 22: Auftreten von Arzneimitteln in Gewässern (Oberfl.wasser: Oberflächenwasser) ....	87
Tabelle 23: Die Präzision der Pipetten Multipette Plus und Liquidator96 wurde in Abhängigkeit vom pipettierten Volumen bestimmt. Hierzu wurden alle Kavitäten von n Mikrotiterplatten mit Farbstofflösung befüllt und die OD aller 96 Kavitäten photometrisch bestimmt. Die angegebenen Werte sind die relative Standardabweichung der 96 Messwerte bzw. bei mehreren Platten der Mittelwert und die Standardabweichung hiervon. Die OD lag bei allen Experimenten zwischen 0,6 und 1,5. Zum Vergleich die Herstellerangaben der zufälligen Messabweichung: Multipette: 0,8 % bei 50 $\mu$ L, Liquidator96: 0,6 % bei 200 $\mu$ L. ....	90
Tabelle 24: In 15 Oberflächenwasserproben wurde an drei verschiedenen Tagen der CBZ-Gehalt bestimmt. Jede Probe wurde an allen drei Tagen in je drei Replikaten gemessen. Dargestellt sind die mittlere Konzentration der Probe, die relative Standardabweichung (RSD) der an den drei verschiedenen Tagen ermittelten mittleren CBZ-Konzentrationen (inter-assay), sowie die gemittelte relative Standardabweichung der drei an einem Tag gemessenen Replikate (intra-assay). Durchführung des ELISAs bei pH 10,5 nach Pipettierschema B.....	91
Tabelle 25: Eine Wasserprobe aus dem Wannsee wurde mit CBZ und Cetirizin dotiert. Die CBZ-Äquivalentkonzentration (cELISA) bei pH 4,5 und 10,5 wurde gemessen (n Replikate, Mittelwert und Standardabweichung sind angegeben). Die gemessenen molaren Kreuzreaktivitäten von 298 % (pH 4,5) und 13,5 % (pH 10,5) wurden benutzt, um die Konzentrationen von CBZ und Cetirizin zu extrapolieren. Hieraus wurde die Wiederfindungsrate der zugefügten Konzentrationen bestimmt. ....	96

Tabelle 26: Relative Wiederfindungsraten in verschiedenen Wasserarten nach Dotierung. Eine Probe wurde mit je zwei Analytkonzentrationen dotiert. Die Werte in Klammern bezeichnen relative Standardabweichungen in Prozent aus zwei Messungen. Leitungswasser wurde ausschließlich mit CBZ dotiert (n.b.: nicht bestimmt). ....	101
Tabelle 27: Proben aus 11 Oberflächengewässern und zwei Klärwerksabläufen wurden sowohl nach Direkteinspritzung als auch nach SPE-Anreicherung analysiert. Angegeben sind die Anzahl der Proben über der Nachweisgrenze und das mittlere Verhältnis der Konzentrationen nach beiden Verfahren (in Klammern: relative Standardabweichung). Ergebnisse der Einzelmessungen befinden sich in Tabelle 34. Ergebnisse für Cetirizin ohne Einsatz eines internen Standards.....	102
Tabelle 28: 5 Oberflächenwasserproben wurden per LC-MS/MS an zwei verschiedenen Tagen je zweimal gemessen. Angegeben ist die relative Standardabweichung (RSD) der Messwerte innerhalb eines Tages (intra-assay) und zwischen den verschiedenen Tagen (inter-assay). Die Proben wurden ohne vorherige Festphasenanreicherung injiziert. ....	103
Tabelle 29: Verhältnis aus den Analytkonzentrationen in Klärwerksablauf und Klärwerkszulauf, Mittelwert und Standardabweichung (in Klammern) aus sechs Beprobungen (s. Tabelle 36), alle Messwerte ermittelt mit LC-MS/MS ohne SPE-Anreicherung.....	120
Tabelle 30: Median-Werte der Stoffkonzentrationen in 100 Wasserproben (s. Abbildung 60). Werte sind absolut in µg/L sowie relativ zur CBZ-Konzentration (CBZ = 100 %) angegeben, Standardabweichung in Klammern. Nur Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze wurden berücksichtigt (<LOQ: unterhalb der Bestimmungsgrenze)...	121
Tabelle 31: Vorkommen von Carbamazepin in Oberflächenwasser, ungeklärtem und geklärtem Abwasser. Angegeben sind der Durchschnitt (D) oder der Median (M), der Höchstwert (Max.) der Studien sowie die Gesamtzahl der Proben n (k.A.: keine Angabe). Wenn in der Studie weder Durchschnitt noch Median angegeben wurden, wurde sofern möglich die Spannweite der Messwerte angegeben.....	139
Tabelle 32: Zwischen 2.11.2009 und 6.8.2010 wurden eine Schöpfprobe aus dem Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf sowie zwei Schöpfproben aus dem Teltowkanal bei km 34,4 und 35,5 genommen. Der Gehalt an CBZ, Cetirizin und Koffein wurde mit ELISA bestimmt, Angaben in µg / L.....	143
Tabelle 33: Zwischen 2.11.2009 und 6.8.2010 wurden eine Schöpfprobe aus dem Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf sowie zwei Schöpfproben aus dem Teltowkanal bei km 34.4 und 35.5 genommen. Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse, Angaben in µg / L, fett gedruckte Werte wurden nach Probenanreicherung mit SPE gewonnen .....	146
Tabelle 34: 11 Proben aus Oberflächenwasser und 2 Proben aus Klärwerksabläufen wurden nach SPE-Anreicherung sowie nach Direkteinspritzung per LC-MS/MS analysiert, alle Analysenergebnisse in µg / L.....	148
Tabelle 35: Cetirizin, CBZ und Metaboliten in 100 Proben aus Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser; Angaben in µg / L, fett gedruckte Werte wurden nach Probenanreicherung mit SPE gewonnen (Abkürzungen: n.b.: nicht bestimmt; S: Schöpfprobe; 2h/24h: 2h bzw. 24h-Mischprobe) .....	149
Tabelle 36: Analysenergebnissen von ELISA und LC-MS/MS der 24h-Mischproben aus den Zuläufen und Abläufen aus sechs Berliner Klärwerken; Angaben in µg / L, fett gedruckte Werte wurden nach Probenanreicherung mit SPE gewonnen .....	152
Tabelle 37 Analyseergebnisse von ELISA und LC-MS/MS der 2h- und 24h-Mischproben aus dem Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf, Angaben in µg/L, fett gedruckte Werte wurden vor der Analyse mit SPE angereichert. ....	153
Tabelle 38: Carbamazepin-Gehalt in Trinkwasserproben aus dem Berliner Stadtgebiet, bestimmt mit ELISA (n = 2) und LC-MS/MS (n = 1), alle Konzentrationsangaben in µg/L.....	155
Tabelle 39: Gehalt an CBZ, Cetirizin und Koffein in Schöpfproben aus Oberflächengewässern, die zwischen 2008 und 2010 in Berlin gesammelt wurden. Bestimmung mit ELISA, alle Angaben in µg/L.....	159



## 6.5 Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

### *Publikationen*

A. Bahlmann, J. J. Carvalho, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Immunoassays as high-throughput tools: Monitoring spatial and temporal variations of carbamazepine, caffeine and cetirizine in surface and wastewaters, *Chemosphere*, 2012, 89(11), 1278-1286

V. Calisto, A. Bahlmann, R. J. Schneider, V. I. Esteves, Application of an ELISA to the quantification of carbamazepine in ground, surface and wastewaters and validation with LC-MS/MS, *Chemosphere*, 2011, 84, 1708-1715

A. Bahlmann, J. Falkenhagen, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Cetirizine as pH-dependent cross-reactant in a carbamazepine-specific immunoassay, *Analyst*, 2011, 136, 1357-1364

A. Bahlmann, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Monitoring carbamazepine in surface and wastewaters by an immunoassay based on a monoclonal antibody, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(6), 1809-20

### *Poster*

A. Lehmann, A. Bahlmann, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Determination of Carbamazepine, Sulfamethoxazole and Cocaine in Surface Water in Berlin by LC-MS/MS and ELISA, 36<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 19.-23.6.2011, Budapest, Ungarn

A. Bahlmann, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Transformation products of pharmaceuticals in surface water – detected by LC-ELISA, Transcon 2010, 12.-17.9.2010, Monte Verità, Ascona, Schweiz

V. Calisto, A. Bahlmann, R. J. Schneider, V. I. Esteves, Determination of the psychiatric drug carbamazepine in waste waters by ELISA. 36<sup>th</sup> International Symposium on Environmental Analytical Chemistry, 5.-9.10.2010, Rom, Italien.

A. Bahlmann, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Seasonal variations of carbamazepine and cetirizine in Teltowkanal, Berlin, monitored by a dual-analyte immunoassay, 3<sup>rd</sup> EuCheMS Chemistry Congress, 29.8.-2.9.2010, Nürnberg

K. Pannenbecker, A. Bahlmann, U. Dünnebier, M. Jekel, R. J. Schneider, Untersuchungen zum Vorkommen von Carbamazepin im Berliner Wasserkreislauf mittels ELISA, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, 10.-12. Mai 2010, Bayreuth

A. Bahlmann, J. J. Carvalho, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Occurrence of Caffeine and Carbamazepine in Teltowkanal and Landwehrkanal, Berlin, 20 Years of Research in the Field of Endocrine Disruptors and Pharmaceutical Compounds - Challenges and Solution for the Water Sector, 10.2.2010, Berlin

A. Bahlmann, R. J. Schneider, M. G. Weller, U. Panne, Immunoassay für die Bestimmung von Carbamazepin in Gewässern, Anakon 2009, 17.-20.3.2009, Berlin

A. Bahlmann, Neue Konzepte für die Kalibrierung und Auswertung von Immunoassays, 2. Doktorandentagung der Arbeitskreise Chemometrik und Labordatenverarbeitung, Chemo- und Biosensoren, Prozessanalytik, Qualitätsmanagement und Elektroanalytische Chemie, 10.-12.2.2008, Attendorn

*Vorträge*

A. Bahlmann, J. J. Carvalho, K. Schultze, A. Lehmann, M. G. Weller, U. Panne, R. J. Schneider, Bestimmung des anthropogenen Markers Carbamazepin im Gewässerkreislauf mit Hilfe eines neuentwickelten Immunoassays (ELISA), Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, 10.-12. Mai 2010, Bayreuth

## 6.6 Ergänzende Daten

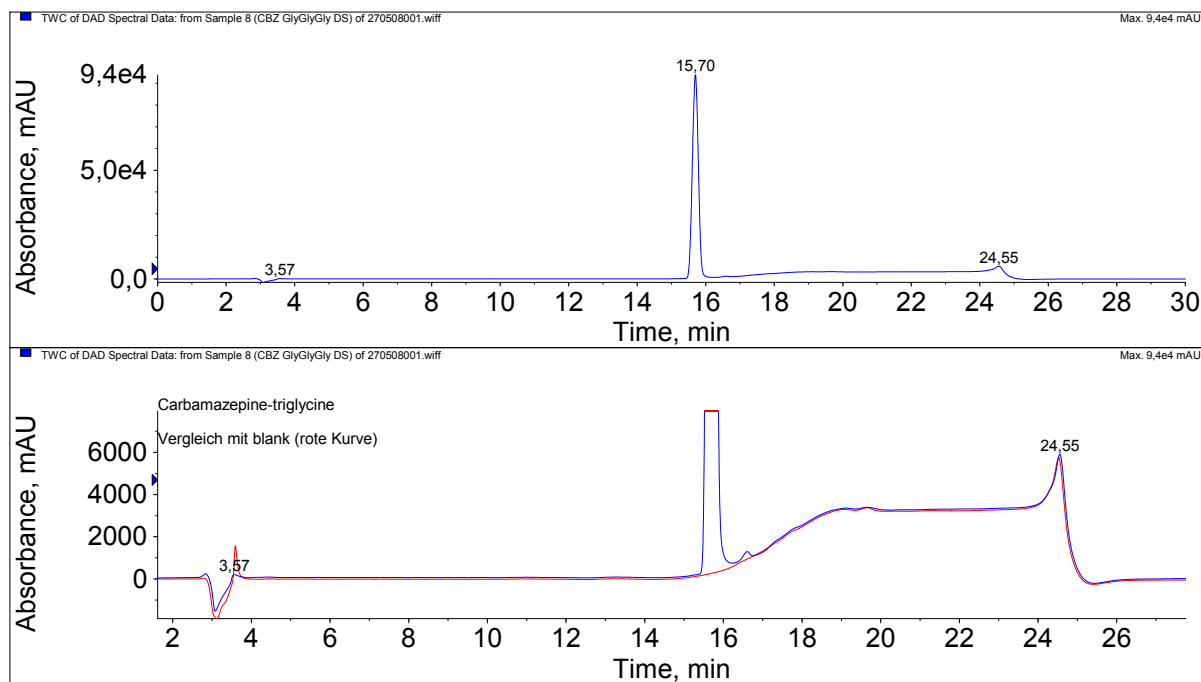


Abbildung 61: Reinheitsüberprüfung von CBZ-Triglycine mittels LC-DAD-UV, die untere Kurve stellt eine Vergrößerung dar.

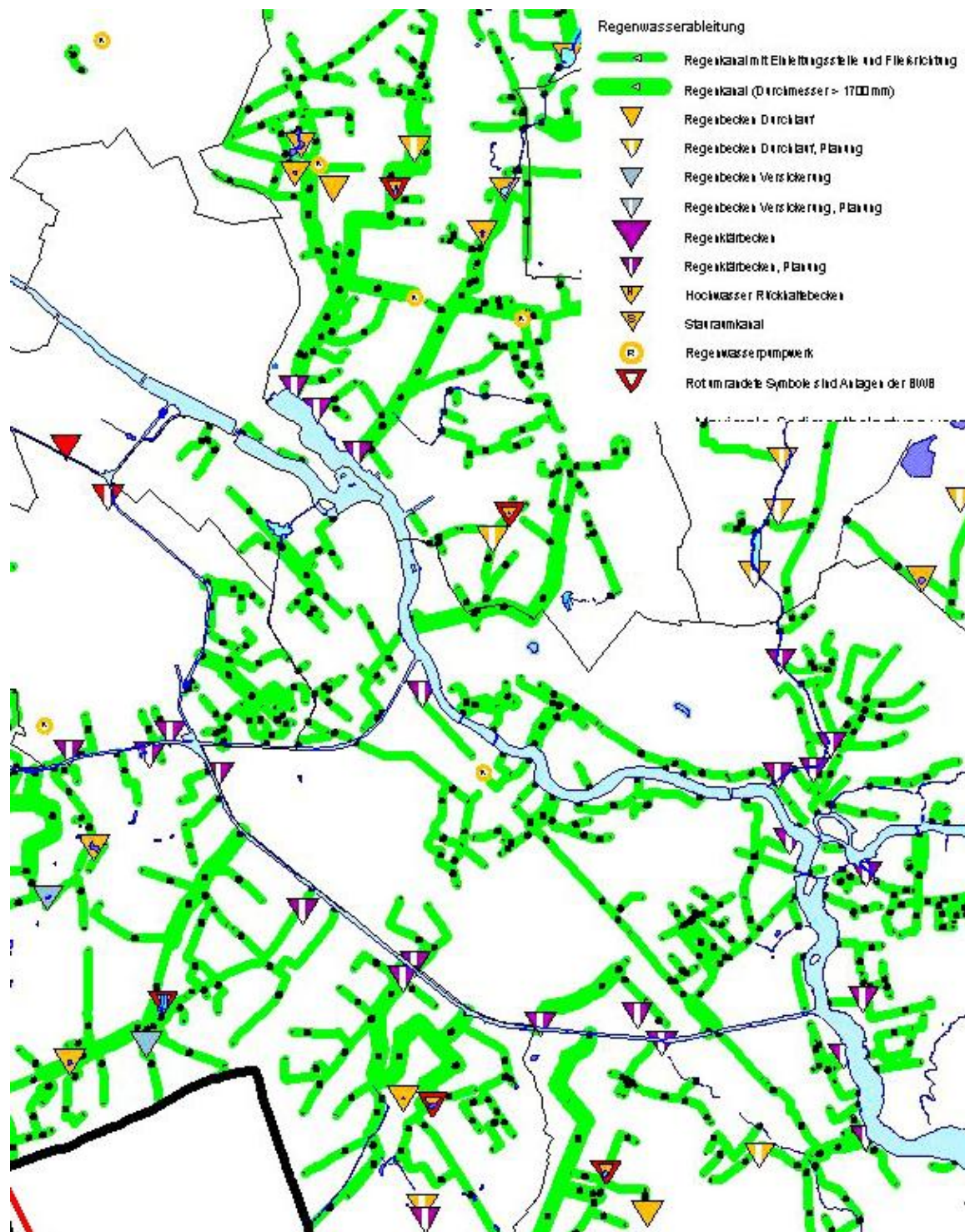


Abbildung 62: Kanalsystem zur Ableitung von Regenwasser im Südosten Berlins. Quelle: Berliner Senatsverwaltung [368]

Tabelle 31: Vorkommen von Carbamazepin in Oberflächenwasser, ungeklärtem und geklärtem Abwasser. Angegeben sind der Durchschnitt (D) oder der Median (M), der Höchstwert (Max.) der Studien sowie die Gesamtzahl der Proben n (k.A.: keine Angabe). Wenn in der Studie weder Durchschnitt noch Median angegeben wurden, wurde sofern möglich die Spannweite der Messwerte angegeben.

Land	Oberflächengewässer			Ungeklärtes Abwasser			Geklärtes Abwasser			Ref.
	D/ M	Max	n	D/M	Max	n	D/M	Max	n	
Australien				1480	1480	1				[369]
Belgien	435 (M)	1005	8							[370]
Bulgarien	109 (D)	205	2							[370]
China							420	420	1	[371]
				100		4	69-120	120	4	[167]
		1090	k.A.	283 (D)	510	4	503 (D)	1110	4	[372]
	15 (D)	94	26	49 (D)	52	2	53 (D)	54	2	[373]
Costa Rica	<1 (M)	82	68							[374]
Dänemark							940	940	1	[161]
	15	15	1							[370]
Deutschland							1070	1070	1	[31]
				1273 (D)		10	1190 (D)		10	[375]
	102-284	284	3				1194	1194	1	[376]
							1310 (D)	1760	8	[377]
	650 (D)	1075	5	1780 (D)	3800	10-20	1630 (D)	5000	20-27	[123]
	230 (M)	1300	8	1450 (M)	2000	12	1650 (M)	2100	12	[165]
	25 (M)	81	3	2000	2000	1	1900	1900	1	[174]
				2000	2000	1	2100	2100	1	[214]
	250 (M)	1100	26	2200 (M)	3000	k.A.	2100 (M)	6300	30	[6, 378]
	207 (M)	657	22				2297	2297	1	[346]
	328 (D)	330	2							[30]
	410 (D)	510	2							[379]
	78 (D)	640	520							[39]
	220 (M) <sup>1</sup>	7100	1790							[127]
	96 (M)	1700	188				210 (M)	3200	3	[37]
	112 (D)	400	11	1050 (D)	1400	4	1000 (D)	1100	4	[380]
				660 (M)	1000	9	740 (M)	1200	9	[381]
	266 (M)	290	2							[382]
	144	285	14							[119]
	420 (M)	1700	130				2880 (M)	5080	33	[133]
	30 (M)	479	32	19 (M)	238	11	78 (M)	369	13	[383]
				350 (M)	1200	5	500 (M)	1000	5	[384]
				1600	2500	118	1800	4100	128	[145]
				2250		72	2400		72	[144]
	245	1870	117							[146]
	173	456	19							[370]
Europa (27 Länder)	75 (M)	11561	122							[129]
Europa <sup>2</sup>							1200 (D)		8	[385]
Europa <sup>3</sup>							419 (D)	1550	24	[386]
Estland	3 (M)	15	3							[370]
Finnland	27 (D)	66	5	333 (D)	400	3	380 (D)	470	3	[387]
				285 (M)	820	21	500 (M)	2440	21	[166]
	70 (M)	370	k.A.	750 (M)	2000	k.A.	400 (M)	600	k.A.	[378]
	29 (M)	80	6							[190]
	33 (D)	54	2							[370]
Frankreich				286 (D)	416	3	172 (D)	258	3	[179]
	25 (D)	83	14				551 (D)	2519	12	[388]

Land	Oberflächengewässer			Ungeklärtes Abwasser			Gekklärtes Abwasser			Ref.
	D/ M	Max	n	D/M	Max	n	D/M	Max	n	
							910 (D)	1200	3	[161, 203]
							1090 (D)	1200	k.A.	[35]
	346 (M)	675	4				1101 (M)	1573	8	[389]
	k.A.	350	3					950	3	[38]
	<1,4 (M)	56	7				225 (D)	293	2	[390]
	78 (M)	800	k.A.				1050 (M)	1400		[378]
							1020	1020	1	[391]
	1,1	2,6	3							[392]
	770 <sup>1</sup>	6720	42							[393]
	k.A.	1150	48							[394]
	49 (M)	204	6							[370]
Griechenland							605 (D)	1030	2	[161]
	< 1	< 1	1							[370]
Großbritannien	60 (D)	120	10				539	650	5	[395]
	80 (D)	140	2				652	652	1	[396]
	92 (M)	205	9							[370]
Wales (GB)	105 (M) <sup>1</sup>	327	>40	1322 (M) <sup>1</sup>	2930	>20	1663 (M) <sup>1</sup>	4598	>20	[350]
	1 (M)	9	4							[397]
	99 (M) <sup>1</sup>	356	>100							[349]
Irland				<10	<10	3	163-881	881	3	[222]
				<60-720	720	36	<60-6500	6500		[164]
	55	55	1							[370]
Israel							660	660	1	[398]
							1290	1700	11	[33]
Italien	12 (D)	64	15				16 (D)	26	3	[399]
							310 (D)	500	4	[161, 203]
							400 (D)	1318	8	[400]
	99 (M) <sup>1</sup>	175	8				291 (M)		7	[401]
	<0,1-345	345	20							[402]
	77	77	1							[370]
Japan				54 (M)	270	16				[403]
	k.A.	65	37				49 (M)	163		[32]
	5,1 (M) <sup>1</sup>	15	34				54 (M)	86	18	[352]
Jordanien	240 (M)	1600	19				1800 (M)	3600	5	[404]
Kanada	4,5 (D)	5	2	220	220	1	203	203	1	[405]
				356	356	1	356	356	1	[158]
	<1-8	8	5	299 (D)	701	3	282 (D)	656	3	[406]
	0,7	0,7	1	369	369	1	426	426	1	[175]
				539	539	1	453	453	1	[178]
				700 (M)	1900	18	700 (M)	2300	18	[407]
	3,3 (D)	16	8							[408]
							99	99	1	[288]
				415 (D)	573	7				[187]
	58 (M)	1030	12							[409]
Kroatien				420 (D)	950	5	410 (D)	530	5	[221]
Litauen	15 (M)	17	4							[370]
Luxemburg	60 (M)	69	3							[370]
Malta	< 1 (M)	3	3							[370]
Mexiko							226 (D)	275	3	[139]
Niederlande	133 (M)	203	4							[370]
Norwegen	7 (M)	10	8				344 (D)	393	2	[180]
	14 (D)	27	2							[370]

Land	Oberflächengewässer			Ungeklärtes Abwasser			Geklärtes Abwasser			Ref.
	D/ M	Max	n	D/M	Max	n	D/M	Max	n	
Österreich				522 (M)	914	12	552 (M)	1110	12	[410]
	47 (M)	133	4							[411]
	30-250	250	45				100-800	800	24	[40]
				704 (M)	1850	5	952 (M)	1595	5	[412]
				1100 (M) <sup>1</sup>	2600	34	1100 (M) <sup>1</sup>	1510	34	[25]
	75 (M)	294	k.A.	912 (M)	2640		960 (M)	1970		[378]
	30 (D)	k.A.	k.A.	850 (D)	890					[103]
Polen	36 (M)	59	5							[370]
				1150 (M)	1600					[378]
	556 (M)	794	4							[397]
Portugal	110 (M)	172	3							[370]
	146	146	1				520 (D)	540	2	[306]
Rumänien	31 (M)	56	13				446	774	5	[413]
	72 (M)	75	4							[414]
	4 (M)	6	4							[370]
Schweden				280	280	1	410	210	1	[415]
							870	870	1	[203]
							665(D)	1180	2	[160, 161]
Schweiz	8 (M)	34	7							[370]
	17 (D)	67	8	840 (D)	2370	9	700 (D)	2000	9	[176]
	30-150	150	k.A.	690 (M)	1900		480 (M)	1600		[378]
	61 (M)	239	7							[370]
Slowenien	12 (M)	16	8							[370]
Spanien							40 (D)	70	6	[228]
							136 (D)	273	19	[416]
	19 (M)	39	3	150 (M)	480	10	100 (M)	290	10	[417]
							156 (D)	220	9	[418]
				310 (D)	2150	84	370 (D)	1290	84	[419]
				370 (D)	k.A.	10				[420]
				500 (D)	2100	8	420 (D)	750	8	[421]
				480 (D)	3780	252	560 (D)	1550	252	[422]
	<2	<2	1	85 (D)	152	2	81 (D)	111	2	[423]
	30 (D)	110	10							[221]
	51 (D)	90	14							[424]
	143 (M)	219	4							[370]
Südkorea	8 (D)	36	12	151 (D)	451	12	92 (D)	195	12	[425]
	25 (D)	61	7				226 (D)	729	6	[110]
	125 (D)	595	20	830 (D)	2350	>4	720 (D)	1940	>4	[426]
				72 (D)	127	5	55 (D)	74	5	[427]
							190 (M)	270	11	[428]
Taiwan	40 (D)	120	3				550 (D)	960	3	[429]
				82-357	357	4	93-214	214	4	[430]
Tschechien	113 (M)	214	5							[370]
Türkei	187 (D)	306	2							[370]
Ungarn	102 (M)	293	6							[370]
USA	1-35	35	25	100	100	1	65	65	1	[431]
	< 0,9 (M)	13	3	38 (D)	51	3	74 (D)	111	3	[432]
							100 (D)	100	2	[29]
				57	57	1	110	110	1	[433]
							110 (D)	140	2	[138]
	22 (D)	132	7				120	120	1	[434]
							263 (D)	297	3	[112]
							416 (D)		16	[105]

Land	Oberflächengewässer			Ungeklärtes Abwasser			Gekklärtes Abwasser			Ref.
	D/ M	Max	n	D/M	Max	n	D/M	Max	n	
	4,5 (M)	5,6	10							[435]
	57 (D)	96	3							[231]
	k.A.	190	74							[436]
	5 (M)	23	120							[437]
							20-560	560	127	[438]
							80 (M)	270	10	[27]
	166 (M)	1500	12							[360] <sup>4</sup>
	43-114	114	k.A.							[439]
	69 (M)	130	8							[440]
							175	175	1	[441]
							450 (M)	800	7	[348]
Zypern	5783 (D)	11561	2							[370]

<sup>1</sup> Median der Median-Konzentrationen aller Teilmengen.

<sup>2</sup> Österreich, Belgien, Frankreich, Deutschland, Spanien

<sup>3</sup> Kroatien, Serbien, Bosnien-Herzegowina

<sup>4</sup> Median- und Höchstkonzentration zitiert aus persönlicher Mitteilung an V. Cunningham [34]



Tabelle 32: Zwischen 2.11.2009 und 6.8.2010 wurden eine Schöpfprobe aus dem Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf sowie zwei Schöpfproben aus dem Teltowkanal bei km 34,4 und 35,5 genommen. Der Gehalt an CBZ, Cetirizin und Koffein wurde mit ELISA bestimmt, Angaben in µg / L

#	Datum	Teltowkanal km 34,4 (stromabwärts)			Teltowkanal km 35,5 (stromaufwärts)			Ablauf des Klärwerks		
		CBZ	Cetirizin	Koffein	CBZ	Cetirizin	Koffein	CBZ	Cetirizin	Koffein
1	2.11.2009	1,3	0,14	0,96						
2	3.11.2009	0,32	0,056	0,24	0,047	<0,025	0,16			
3	4.11.2009	0,22	0,030	0,27	0,056	<0,025	0,031			
4	5.11.2009	0,25	0,038	0,15	0,040	<0,025	0,052			
5	6.11.2009	0,096	<0,025	0,063	0,047	<0,025	<0,025			
6	7.11.2009	0,82	0,11	0,55	0,042	<0,025	0,088			
7	8.11.2009	0,93	0,14	0,60	0,048	<0,025	0,33			
8	9.11.2009	0,98	0,15	0,73	0,048	<0,025	0,058			
9	10.11.2009	0,45	0,061	0,25	0,057	<0,025	0,057			
10	11.11.2009	0,27	0,044	0,13	0,049	<0,025	0,054			
11	12.11.2009	0,38	0,057	0,28	0,059	0,028	0,40			
12	13.11.2009	0,31	0,046	0,16	0,042	<0,025	<0,025			
15	16.11.2009	0,99	0,15	0,47	0,049	<0,025	<0,025			
16	17.11.2009	1,1	0,12	0,57	0,045	<0,025	0,030			
17	18.11.2009	0,28	0,039	0,15	0,049	<0,025	<0,025			
18	19.11.2009	0,58	0,061	0,33	0,054	<0,025	0,076			
19	20.11.2009	0,28	0,029	0,12	0,046	<0,025	0,027			
22	23.11.2009	1,0	0,18	0,53	0,055	<0,025	0,052			
23	24.11.2009	0,69	0,14	0,45	0,053	<0,025	0,35			
24	25.11.2009	0,43	0,074	0,17	0,043	<0,025	0,049			
25	26.11.2009	1,0	0,10	0,38	0,045	<0,025	0,027			
26	27.11.2009	1,1	0,084	0,64	0,047	<0,025	0,048			
29	30.11.2009	0,65	<0,025	0,50	0,042	<0,025	0,053			
30	1.12.2009	1,8	0,083	0,88	0,41	0,047	0,28			
31	2.12.2009	0,76	0,082	0,38	0,043	<0,025	0,073			
32	3.12.2009	0,31	0,027	0,18	0,045	<0,025	0,064			
33	4.12.2009	0,85	0,14	0,48	0,039	<0,025	0,057			
36	7.12.2009	0,43	0,032	0,21	0,044	<0,025	0,073			
37	8.12.2009	0,76	0,13	0,38	0,048	<0,025	0,050			
38	9.12.2009	0,58	0,076	0,32	0,059	<0,025	0,049			
39	10.12.2009	0,85	0,077	0,44	0,057	0,031	0,037			
40	11.12.2009	0,76	0,048	0,36	0,036	<0,025	0,059			
43	14.12.2009	0,78	0,066	0,38	0,039	<0,025	0,093			
44	15.12.2009	0,74	0,056	0,34	0,049	<0,025	0,045			
45	16.12.2009	1,0	0,079	0,47	0,044	<0,025	0,058			
46	17.12.2009	0,71	0,097	0,43	0,046	<0,025	0,091			
47	18.12.2009	0,53	0,042	0,30	0,045	<0,025	0,14			
67	6.1.2010	0,45	0,055	0,30	0,032	<0,025	0,099			
68	7.1.2010	0,52	0,041	0,29						
69	8.1.2010	0,51	0,025	0,28	0,047	<0,025	0,094			
72	11.1.2010	0,49	<0,025	0,26	0,047	<0,025	0,094			
73	12.1.2010	0,57	<0,025	0,29	0,034	<0,025	0,099			
74	13.1.2010	0,42	0,054	0,22	0,043	<0,025	0,11			
75	14.1.2010	0,48	0,062	0,26	0,051	<0,025	0,082			
76	15.1.2010	0,46	0,085	0,30	0,038	<0,025	0,077			
79	18.1.2010	0,53	<0,025	0,32	0,043	0,039	0,099			
80	19.1.2010	0,41	0,045	0,26	0,047	<0,025	0,100			
81	20.1.2010	0,42	0,051	0,25	0,043	<0,025	0,078			

#	Datum	Teltowkanal km 34,4 (stromabwärts)			Teltowkanal km 35,5 (stromaufwärts)			Ablauf des Klärwerks		
		CBZ	Cetirizin	Koffein	CBZ	Cetirizin	Koffein	CBZ	Cetirizin	Koffein
82	21.1.2010	0,38	0,074	0,49	0,051	<0,025	0,078			
83	22.1.2010	0,37	0,057	0,30	0,026	0,026	0,067			
86	25.1.2010	0,47	0,094	0,35	0,047	<0,025	0,26			
87	26.1.2010	0,53	0,068	0,32						
88	27.1.2010	0,51	0,068	0,32	0,044	<0,025	0,087			
89	28.1.2010	0,35	0,031	0,25	0,034	<0,025	0,094			
90	29.1.2010	0,52	0,058	0,32						
93	1.2.2010	0,54	0,080	0,32	0,039	<0,025	0,11			
94	2.2.2010	0,46	0,030	0,26	0,057	<0,025	0,12			
95	3.2.2010	0,46	0,083	0,28						
96	4.2.2010	0,46	0,043	0,27						
97	5.2.2010	0,48	0,082	0,30						
100	8.2.2010	0,61	0,075	0,33	0,036	<0,025	0,067			
101	9.2.2010	0,36	0,076	0,21						
102	10.2.2010	0,52	0,089	0,27						
103	11.2.2010	0,40	0,079	0,20						
104	12.2.2010	0,44	0,064	0,23						
107	15.2.2010	0,60	0,12	0,34						
108	16.2.2010	0,57	0,057	0,31						
109	17.2.2010	0,46	0,028	0,29	0,038	<0,025	0,077			
110	18.2.2010	0,52	0,063	0,32	0,058	<0,025	0,11			
111	19.2.2010	0,65	0,075	0,34	0,043	<0,025	0,35			
114	22.2.2010	0,87	0,12	0,44	0,042	<0,025	0,10			
115	23.2.2010	1,4	0,13	0,56	0,052	<0,025	0,29			
116	24.2.2010	0,40	0,056	0,24	0,050	<0,025	0,097			
117	25.2.2010	0,34	0,042	0,20	0,042	<0,025	0,10			
118	26.2.2010	0,31	0,035	0,20	0,050	<0,025	0,099			
123	3.3.2010	0,13	<0,025	0,13	0,045	<0,025	0,082			
124	4.3.2010	0,12	<0,025	0,10	0,040	<0,025	0,11	2,2	0,14	1,0
125	5.3.2010	0,094	<0,025	0,12	0,040	<0,025	0,11	2,2	0,38	1,1
128	8.3.2010	0,27	0,037	0,20	0,043	<0,025	0,12			
129	9.3.2010	0,25	0,026	0,17	0,046	<0,025	0,090	1,9	0,29	1,0
130	10.3.2010	0,32	0,033	0,23				2,1	0,32	1,1
131	11.3.2010	0,32	0,049	0,26	0,046	<0,025	0,092	2,2	0,21	1,0
132	12.3.2010	0,44	0,056	0,27	0,042	<0,025	0,11	1,9	0,25	1,0
135	15.3.2010	0,26	0,034	0,22	0,036	<0,025	0,11	1,8	0,28	0,83
136	16.3.2010	0,082	<0,025	0,11	0,036	<0,025	0,088	4,5	0,39	0,94
137	17.3.2010	0,61	0,034	0,20	0,035	<0,025	0,095	4,4	0,46	1,0
138	18.3.2010	1,8	0,044	0,47	0,041	<0,025	0,10			
139	19.3.2010	1,4	0,059	0,39	0,039	<0,025	0,10	3,5	0,41	1,0
142	22.3.2010	0,81	0,11	0,41	0,043	<0,025	0,086	2,4	0,39	0,95
143	23.3.2010	0,68	0,11	0,27	0,032	<0,025	0,10	2,2	0,42	0,83
145	25.3.2010	0,71	0,13	0,36	0,034	<0,025	0,091			
146	26.3.2010	0,77	0,10	0,32	0,026	<0,025	0,091	2,3	0,32	0,84
149	29.3.2010	0,61	0,090	0,30	0,032	<0,025	0,12	2,0	0,45	0,80
150	30.3.2010	0,57	0,082	0,30	0,034	<0,025	0,12	2,1	0,49	0,81
151	31.3.2010	0,57	0,088	0,24	0,036	<0,025	0,32			
152	1.4.2010	0,69	0,083	0,29	0,033	<0,025	0,086	2,2	0,50	0,96
157	6.4.2010	0,77	0,098	0,31	0,039	<0,025	0,088	2,3	0,49	0,86
158	7.4.2010	0,77	0,14	0,34	0,040	<0,025	0,095			
159	8.4.2010	0,75	0,14	0,37	0,041	<0,025	0,11	2,2	0,55	0,91
160	9.4.2010	0,91	0,15	0,39	0,027	<0,025	0,085			
163	12.4.2010	0,97	0,23	0,47	0,036	<0,025	0,073	2,2	0,66	0,93

#	Datum	Teltowkanal km 34,4 (stromabwärts)			Teltowkanal km 35,5 (stromaufwärts)			Ablauf des Klärwerks		
		CBZ	Cetirizin	Koffein	CBZ	Cetirizin	Koffein	CBZ	Cetirizin	Koffein
164	13.4.2010	0,90	0,21	0,38	0,035	<0,025	0,088			
165	14.4.2010	1,2	0,28	0,53	0,036	<0,025	0,057			
166	15.4.2010	0,89	0,20	0,44	0,038	<0,025	0,073			
167	16.4.2010	0,86	0,15	0,41	0,039	<0,025	0,068	1,9	0,64	0,90
170	19.4.2010	1,5	0,39	0,61	0,028	<0,025	0,18	2,1	0,65	0,88
171	20.4.2010	1,1	0,21	0,48	<0,025	<0,025	0,072			
172	21.4.2010	1,2	0,65	0,55	0,027	<0,025	0,081			
173	22.4.2010	0,92	0,37	0,51						
174	23.4.2010	1,4	0,36	0,57	0,029	<0,025	0,072			
184	3.5.2010	2,0	0,85	0,78	0,030	<0,025	0,14	2,1	0,72	0,82
185	4.5.2010	0,77	0,22	0,35	0,028	<0,025	0,072	1,8	0,62	0,66
186	5.5.2010	0,65	0,22	0,33	0,028	<0,025	0,065	1,9	0,56	0,60
188	7.5.2010	0,84	0,19	0,46	<0,025	<0,025	0,10	1,9	0,52	0,71
198	17.5.2010	0,89	0,18	0,41	<0,025	<0,025	0,063	1,7	0,53	0,67
199	18.5.2010	0,96	0,20	0,43	<0,025	<0,025	0,062	1,6	0,38	
200	19.5.2010	2,0	0,61	0,75	0,14	0,052	0,13	1,9	0,60	0,85
201	20.5.2010	0,83	0,081	0,37	0,028	<0,025	0,075			
202	21.5.2010	0,95	0,12	0,39	0,031	<0,025	0,067	1,8	0,43	0,66
207	25.5.2010	0,83	0,13	0,40	0,035	<0,025	0,067	2,0	0,40	0,79
210	28.5.2010	1,1	0,11	0,45	0,031	<0,025	0,071	1,9	0,36	0,70
213	31.5.2010	0,95	0,13	0,39	0,031	<0,025	0,089	2,1	0,26	0,74
217	4.6.2010	0,93	0,11	0,48	0,045	<0,025	0,070	1,7	0,38	0,85
220	7.6.2010	0,69	0,15	0,40	0,043	<0,025	0,085	1,8	0,41	0,91
222	9.6.2010	0,87	0,18	0,44	0,053	<0,025	0,070	2,3	0,45	0,83
224	11.6.2010	0,88	0,17	0,50	0,028	<0,025	0,092	2,0	0,48	0,87
227	14.6.2010	0,92	0,27	0,57	0,038	<0,025	0,086	2,0	0,65	0,89
229	16.6.2010	0,55	0,23	0,35	0,032	<0,025	0,16	2,2	0,67	0,85
234	30.6.2010							2,4	0,51	0,83
241	28.6.2010	1,2	0,55	0,65	0,45	0,076	0,24	2,1	0,93	0,90
243	30.6.2010	2,2	0,44	0,76	2,2	0,44	0,82	2,7	0,45	1,0
245	2.7.2010	2,2	0,76	0,93	2,3	0,48	0,88	2,4	0,88	0,89
249	6.7.2010	2,1	0,61	0,92	2,1	0,47	0,92	2,6	0,92	0,99
250	7.7.2010	2,2	0,66	0,97	2,1	0,38	0,95	2,6	0,72	1,0
256	13.7.2010	2,0	0,56	0,95	2,0	0,51	0,93	2,5	0,79	1,0
257	14.7.2010	2,2	0,61	0,96	2,3	0,29	1,1	2,5	0,83	0,98
259	16.7.2010	2,3	0,56	1,1	2,4	0,44	0,94	2,8	0,69	1,2
262	19.7.2010	1,3	0,24	1,3	0,41	<0,025	0,22	2,2	0,51	0,91
264	21.7.2010	1,0	0,11	0,51	0,42	0,066	0,30	2,3	0,46	1,1
269	26.7.2010	1,6	0,22		0,36	0,040		1,8	0,42	
271	28.7.2010	1,2	0,17		0,22	<0,025		1,8	0,35	
273	30.7.2010	1,0	0,14		0,058	<0,025		2,0	0,43	
276	2.8.2010	0,87	0,11		0,11	<0,025		1,8	0,32	
278	4.8.2010	0,68	0,089		0,079	0,070		1,9	0,31	
280	6.8.2010	0,79	0,10		0,052	<0,025		1,9	0,35	

Tabelle 33: Zwischen 2.11.2009 und 6.8.2010 wurden eine Schöpfprobe aus dem Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf sowie zwei Schöpfproben aus dem Teltowkanal bei km 34.4 und 35.5 genommen. Ergebnisse der LC-MS/MS-Analyse, Angaben in µg / L, fett gedruckte Werte wurden nach Probenanreicherung mit SPE gewonnen

#	Datum	CBZ	Cetirizin	Koffein	DiOH-CBZ	2-OH-CBZ	10-OH-CBZ	EP-CBZ	3-OH-CBZ	Ox-CBZ
<i>Teltowkanal km 34.4</i>										
1	2.11.2009	1,2		<LOQ						
3	4.11.2009	0,19	<LOQ	<LOQ	0,46	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
5	6.11.2009	0,092	<LOD	<LOD	0,23	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
8	9.11.2009	0,96		<LOD						
16	17.11.2009	1,1	0,086	<LOD	2,9	0,12	0,39	0,077	0,098	<LOD
29	30.11.2009	0,75	<LOQ	<LOD	1,9	0,080	0,16	0,063	0,058	<LOD
30	1.12.2009	1,6	0,12	<LOQ	3,0	0,12	0,16	0,092	0,11	<LOD
45	16.12.2009	0,97	0,084	<LOD	2,5	0,11	0,40	0,063	0,098	<LOD
46	17.12.2009	0,60		<LOD						
73	12.1.2010	0,47	<LOQ	<LOD	1,3	0,064	0,17	0,041	0,053	<LOD
93	1.2.2010	0,48	<LOQ	<LOD	1,4	0,069	0,26	0,036	0,054	<LOD
100	8.2.2010	0,59	<LOQ	<LOD	1,5	0,073	0,29	0,042	0,062	<LOD
115	23.2.2010	1,3	0,11	<LOD	2,9	0,13	0,61	0,070	0,11	<LOQ
123	3.3.2010	0,11	<LOD	<LOD	0,22	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
129	9.3.2010	0,21	<LOQ	<LOD	0,49	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
135	15.3.2010	<b>0,24</b>	<b>0,024</b>	<b>0,13</b>	<b>0,52</b>	<b>0,032</b>	<b>0,10</b>	<b>0,018</b>	<b>0,025</b>	<LOD
136	16.3.2010	<b>0,082</b>	<b>0,0024</b>	<b>0,15</b>	<b>0,13</b>	<b>0,0025</b>	<b>0,014</b>	<LOD	<b>0,0030</b>	<LOD
137	17.3.2010	0,56	<LOQ	<LOD	0,51	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
138	18.3.2010	1,8	0,095	<LOD	1,9	0,090	0,39	0,047	0,073	<LOD
151	31.3.2010	0,51	0,12	<LOD		<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
160	9.4.2010	0,76	0,17	<LOD		<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
170	19.4.2010	1,4	0,41	<LOD	2,1	0,074	0,28	0,050	<LOQ	<LOD
172	21.4.2010	1,2	0,46	<LOD	1,9	0,076	0,29	0,046	<LOQ	<LOD
173	22.4.2010	0,93	0,37	<LOD	1,4	<LOQ	0,21	0,045	<LOQ	<LOD
184	3.5.2010	2,0	0,72	<LOD	3,3	0,11	0,47	0,083	0,11	0,16
186	5.5.2010	0,76	0,23	<LOD	1,0	<LOQ	0,17	0,034	<LOD	<LOD
199	18.5.2010	1,0	0,22	<LOD	1,4	0,060	0,25	0,049	<LOQ	<LOD
200	19.5.2010	1,9	0,40	<LOD	3,0	0,12	0,48	0,071	0,094	0,21
213	31.5.2010	0,97	0,21	<LOD	1,4	<LOQ	0,21	0,038	<LOD	<LOQ
222	9.6.2010	0,81	0,21	<LOD		<LOQ	0,13	<LOQ	<LOQ	<LOD
<i>Teltowkanal km 35.5</i>										
2	3.11.2009	0,039		<LOD						
11	12.11.2009	<b>0,043</b>	<LOD	<b>0,47</b>	<b>0,11</b>	<b>0,0021</b>	<LOQ	<b>0,0025</b>	<LOQ	<LOD
23	24.11.2009	<b>0,048</b>	<LOD	<b>0,25</b>	<b>0,13</b>	<b>0,0025</b>	<LOQ	<b>0,0022</b>	<LOQ	<LOD
26	27.11.2009	0,045		<LOD						
30	1.12.2009	0,42		<LOD						
46	17.12.2009	0,042		<LOD						
111	19.2.2010	<b>0,046</b>	<LOD	<b>0,36</b>	<b>0,14</b>	<b>0,0040</b>	<b>0,012</b>	<b>0,0033</b>	<b>0,0025</b>	<LOD
115	23.2.2010	<b>0,050</b>	<LOD	<b>0,32</b>	<b>0,14</b>	<b>0,0045</b>	<b>0,013</b>	<b>0,0032</b>	<b>0,0027</b>	<LOD
151	31.3.2010	<b>0,032</b>	<LOD	<b>0,33</b>	<b>0,091</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,0079</b>	<b>0,0022</b>	<LOQ	<LOD
<i>Klärwerksablauf</i>										
124	3.3.2010	2,0	0,22	<LOD	3,4	0,11	0,54	0,10	0,14	<LOQ
132	12.3.2010	1,9	0,22	<LOD	3,3	0,12	0,33	0,078	0,13	0,17
137	17.3.2010	4,5	0,22	<LOD	3,4	0,17	0,35	0,094	0,17	<LOD
143	23.3.2010	2,0	0,26	<LOD	2,7	0,096	0,34	0,058	0,078	<LOQ

#	Datum	CBZ	Cetirizin	Koffein	DiOH-CBZ	2-OH-CBZ	10-OH-CBZ	EP-CBZ	3-OH-CBZ	Ox-CBZ
150	30.3.2010	1,9	0,43	<LOD	2,9	0,11	0,42	0,076	0,11	<LOQ
159	8.4.2010	2,0	0,50	<LOD	3,4	0,16	0,49	0,066	0,12	<LOQ
170	19.4.2010	1,9	0,63	<LOD	3,4	0,12	0,45	0,086	0,11	<LOQ
184	3.5.2010	1,9	0,68	<LOD	3,1	0,11	0,47	0,064	0,088	0,18
188	7.5.2010	1,9	0,50	<LOD	2,6	0,11	0,45	0,068	0,090	<LOQ
200	19.5.2010	1,8	0,38	<LOD	3,0	0,10	0,46	0,073	0,078	0,20
213	31.5.2010	1,9	0,39	<LOD	3,1	0,13	0,45	0,059	0,100	0,25
222	9.6.2010	1,8	0,42	<LOD	3,1	0,11	0,37	0,059	0,100	0,23

Tabelle 34: 11 Proben aus Oberflächenwasser und 2 Proben aus Klärwerksabläufen wurden nach SPE-Anreicherung sowie nach Direkteinspritzung per LC-MS/MS analysiert, alle Analyseergebnisse in µg / L.

Probenahmeort	Datum	CBZ		Cetirizin		EP-CBZ		DiOH-CBZ		10-OH-CBZ		2-OH-CBZ		3-OH-CBZ	
		direkt	nach SPE	direkt	nach SPE	direkt	nach SPE	direkt	nach SPE	direkt	nach SPE	direkt	nach SPE	direkt	nach SPE
Teltowkanal km 36,0	16.9.09	0,036	0,037	<LOQ	0,002	0,12	0,17	<LOQ	0,09	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,001	<LOQ	<LOQ
Teltowkanal km 34,7	16.9.09	1,98	2,00	0,21	0,19	0,093	0,13	3,82	4,43	0,60	0,86	0,29	0,34	0,21	0,28
Teltowkanal km 34,2	16.9.09	1,50	1,51	0,17	0,14	0,065	0,089	2,95	3,46	0,46	0,63	0,22	0,25	0,16	0,20
Teltowkanal km 32,4	16.9.09	1,09	1,09	0,12	0,10	0,057	0,079	2,05	2,47	0,31	0,43	0,13	0,17	0,11	0,13
Teltowkanal km 31,9	16.9.09	0,94	0,94	0,11	0,089	<LOQ	0,009	1,80	2,22	0,27	0,36	0,13	0,14	0,09	0,11
Spree km 30,0	16.9.09	0,14	0,14	<LOQ	0,008	<LOQ	0,025	0,31	0,38	<LOQ	0,047	<LOQ	0,012	<LOQ	0,010
Wannsee	23.9.09	0,34	0,33	<LOQ	0,026	<LOQ	0,019	0,67	0,86	<LOQ	0,065	<LOQ	0,020	<LOQ	0,009
Unterhavel (UHW ) km 3,0	23.9.09	0,24	0,23	<LOQ	0,016	0,030	0,035	0,50	0,63	<LOQ	0,041	<LOQ	0,017	<LOQ	0,008
Oberhavel (HOW) km 1,1	23.9.09	0,41	0,40	<LOQ	0,030	<LOQ	0,014	0,85	1,01	<LOQ	0,065	<LOQ	0,018	<LOQ	0,001
Spree km 0,3	23.9.09	0,19	0,19	<LOQ	0,012	<LOQ	0,010	0,41	0,51	<LOQ	0,032	<LOQ	0,013	<LOQ	0,008
Spree km 8,3	23.9.09	0,16	0,16	<LOQ	0,010	0,10	0,13	0,32	0,40	<LOQ	0,029	<LOQ	0,012	<LOQ	0,008
Klärwerksablauf Waßmannsdorf (24h)	28.3.2010	2,17	2,18	0,47	0,45	0,11	0,16	3,73	4,14	0,64	0,68	0,15	0,26	0,14	0,20
Klärwerksablauf Waßmannsdorf (24h)	7.4.2010	2,09	2,29	0,51	0,50	0,12	0,17	4,13	4,86	0,76	0,99	0,17	0,30	0,14	0,23

Tabelle 35: Cetirizin, CBZ und Metaboliten in 100 Proben aus Trinkwasser, Oberflächenwasser und Abwasser; Angaben in µg / L, fett gedruckte Werte wurden nach Probenanreicherung mit SPE gewonnen (Abkürzungen: n.b.: nicht bestimmt; S: Schöpfprobe; 2h/24h: 2h bzw. 24h-Mischprobe)

Nr.	Bezeichnung	Typ	Datum	ELISA			LC-MS/MS								
				CBZ	Cetiri- zin	Kof- fein	CBZ	Cetirizin	Koffein	DtOH- CBZ	2-OH- CBZ	10-OH- CBZ	EP-CBZ	3-OH- CBZ	Ox- CBZ
1	Trinkwasser #70	S	März 2010	0,11	n. b.	n. b.	0,10	<LOD	<LOD	0,14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
2	Trinkwasser #125	S	März 2010	0,15	n. b.	n. b.	0,10	<LOD	<LOD	0,14	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3	Trinkwasser #127	S	März 2010	0,14	n. b.	n. b.	0,10	<LOD	<LOD	0,16	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
4	Trinkwasser #149	S	März 2010	0,15	n. b.	n. b.	0,11	<LOD	<LOD	0,16	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
5	Trinkwasser #126	S	März 2010	0,13	n. b.	n. b.	0,11	<LOD	<LOD	0,23	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	Trinkwasser #49	S	März 2010	0,13	n. b.	n. b.	0,12	<LOD	<LOD	0,17	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7	Teltowkanal km 35,5 #151	S	31.3.2010	0,036	<LOQ	0,32	0,032	<LOD	0,33	0,091	0,0023	0,0079	0,0022	<LOQ	<LOD
8	Teltowkanal km 36,0	S	16.9.2009	0,042	<LOQ	n. b.	0,037	0,01	n. b.	0,092	<LOD	<LOD	0,0021	0,0036	n. b.
9	Müggelspreewasser km 3,1	S	22.6.2009	0,032	n. b.	0,11	0,040	<LOD	<LOD	0,15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n. b.
10	Teltowkanal km 35,5 #11	S	12.11.2009	0,059	0,03	0,40	0,043	<LOD	0,47	0,11	0,0021	<LOQ	0,0025	<LOQ	<LOD
11	Teltowkanal km 35,5 #111	S	19.2.2010	0,043	<LOQ	0,35	0,046	<LOD	0,36	0,14	0,0040	0,012	0,0033	0,0025	<LOD
12	Teltowkanal km 35,5 #23	S	24.11.2009	0,053	<LOQ	0,35	0,048	<LOD	0,25	0,13	0,0025	<LOQ	0,0022	<LOQ	<LOD
13	Teltowkanal km 35,5 #115	S	23.2.2010	0,052	<LOQ	0,29	0,050	<LOD	0,32	0,14	0,0045	0,013	0,0032	0,0027	<LOD
14	Spree km 21,8	S	16.6.2009	0,073	n. b.	0,09	0,063	<LOD	<LOD	0,20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n. b.
15	Spree km 12,0	S	16.6.2009	0,081	n. b.	0,10	0,064	<LOD	<LOD	0,20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n. b.
16	Berlin-Spandauer Schifffahrtskanal	S	7.4.2010	0,092	n. b.	0,31	0,069	<LOD	0,31	0,18	0,01	0,02	0,0040	0,0035	<LOD
17	Spree km 21,5	S	6.4.2010	0,097	n. b.	0,19	0,071	<LOD	<LOD	0,14	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
18	Spree km 20,0	S	7.4.2010	0,11	n. b.	0,13	0,073	<LOD	<LOD	0,13	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
19	Spree km 0,3	S	16.6.2009	0,10	n. b.	0,48	0,081	<LOQ	<LOQ	0,25	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n. b.
20	Spree km 31,2	S	22.6.2009	0,092	n. b.	0,11	0,082	<LOD	<LOD	0,37	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n. b.
21	Teltowkanal km 34,4 #136	S	16.3.2010	0,082	<LOQ	0,11	0,082	0,00	0,15	0,13	0,0025	0,014	<LOD	0,0030	<LOD
22	Spree km 25,5	S	6.4.2010	0,11	n. b.	0,19	0,090	<LOD	<LOD	0,17	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD
23	Teltowkanal km 34,4 #5	S	6.11.2009	0,10	<LOQ	0,06	0,092	<LOD	<LOD	0,23	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOD	n. b.
24	Neuenhagener Mühlenfließ	S	22.6.2009	0,13	n. b.	0,36	0,11	<LOQ	<LOQ	0,45	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	n. b.
25	Havel (UHW) km 3,0	S	16.6.2009	0,14	0,03	0,51	0,13	<LOQ	<LOQ	0,42	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	n. b.
26	Spree km 30,0	S	16.9.2009	0,15	<LOQ	n. b.	0,14	0,013	n. b.	0,35	0,011	0,029	0,009	0,013	n. b.
27	Spree km 0,3	S	23.9.2009	0,16	<LOQ	n. b.	0,16	0,015	n. b.	0,36	0,011	0,017	0,010	0,011	n. b.
28	Spree km 8,3	S	23.9.2009	0,20	<LOQ	n. b.	0,19	0,016	n. b.	0,46	0,011	0,028	0,011	0,010	n. b.
29	Havel (UHW) km 3,0	S	23.9.2009	0,24	<LOQ	n. b.	0,24	0,022	n. b.	0,57	0,014	0,028	0,017	0,010	n. b.

Nr.	Bezeichnung	Typ	Datum	ELISA		LC-MS/MS									
				CBZ	Cetiri- zin	Kof- fein	CBZ	Cetirizin	Koffein	DiOH- CBZ	2-OH- CBZ	10-OH- CBZ	EP-CBZ	3-OH- CBZ	Ox- CBZ
30	Teltowkanal km 34,4 #135	S	15.3.2010	0,26	0,03	0,22	<b>0,24</b>	<b>0,024</b>	<b>0,13</b>	<b>0,52</b>	<b>0,032</b>	<b>0,101</b>	<b>0,018</b>	<b>0,025</b>	<b>&lt;LOD</b>
31	Spree km 26,2	S	6.4.2010	0,30	n. b.	0,25	0,26	<LOQ	<LOD	0,45	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
32	Wannsee	S	25.11.2009	0,31	n. b.	n. b.	0,26	<LOD	n. b.	0,52	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	n. b.
33	Wannsee	S	16.6.2009	0,27	0,05	0,23	0,28	0,06	<LOD	0,54	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
34	Wannsee	S	25.3.2010	0,34	0,04	n. b.	0,32	<LOQ	<LOQ	0,54	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
35	Havel (HOW) km 1,1	S	16.6.2009	0,33	0,04	0,12	0,33	<LOQ	<LOD	0,59	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
36	Wannsee	S	23.9.2009	0,36	0,03	n. b.	<b>0,33</b>	<b>0,032</b>	<b>n. b.</b>	<b>0,77</b>	<b>0,017</b>	<b>0,049</b>	<b>0,023</b>	<b>0,011</b>	<b>n. b.</b>
37	Havel (HOW) km 1,1	S	23.9.2009	0,43	0,03	n. b.	<b>0,41</b>	<b>0,031</b>	<b>n. b.</b>	<b>0,87</b>	<b>0,016</b>	<b>0,056</b>	<b>0,032</b>	<b>0,0027</b>	<b>n. b.</b>
38	Teltowkanal km 18,7	S	9.6.2009	0,50	0,12	0,17	0,47	0,18	<LOD	0,82	<LOQ	<LOQ	0,035	<LOQ	<LOD
39	Teltowkanal 34,4	S	1.2.2010	0,54	0,08	0,32	0,48	<LOQ	<LOD	1,4	0,069	0,26	0,036	0,054	<LOD
40	Teltowkanal km 17,9	S	9.6.2009	0,61	n. b.	0,33	0,53	0,19	<LOD	0,91	0,055	<LOQ	0,038	<LOQ	<LOD
41	Teltowkanal km 8,2	S	9.6.2009	0,68	n. b.	0,64	0,61	0,23	<LOQ	1,0	<LOQ	<LOQ	0,042	<LOQ	<LOQ
42	Stölpchensee	S	25.3.2010	0,61	0,04	n. b.	0,63	<LOQ	<LOQ	0,71	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD
43	Teltowkanal km 34,3	S	2.6.2009	0,61	0,18	0,14	0,64	0,19	<LOD	1,0	0,064	<LOQ	0,044	<LOQ	<LOD
44	Havel (Tegeler See)	S	24.11.2009	0,74	n. b.	n. b.	0,66	<LOQ	n. b.	1,2	0,052	<LOQ	0,044		n. b.
45	Teltowkanal km 6,5	S	9.6.2009	0,76	n. b.	0,43	0,67	0,24	<LOQ	1,2	0,050	<LOQ	0,055	0,055	<LOQ
46	Teltowkanal km 9,6	S	9.6.2009	0,77	n. b.	0,61	0,69	0,25	<LOQ	1,2	<LOQ	0,13	0,048	0,051	<LOD
47	Teltowkanal km 3,5	S	25.3.2010	0,72	0,07	n. b.	0,74	0,065	<LOQ	0,87	<LOQ	0,16	0,032	<LOQ	<LOD
48	Teltowkanal km 34,4 #29	S	30.11.2009	0,65	<LOQ	0,50	0,75	<LOQ	<LOD	1,9	0,080	0,16	0,063	0,058	<LOD
49	Teltowkanal km 34,4 #186	S	5.5.2010	0,65	0,22	0,33	0,76	0,23	<LOQ	1,0	<LOQ	0,17	0,034	<LOD	<LOD
50	Teltowkanal km 17,0	S	9.6.2009	0,76	0,26	0,37	0,76	0,27	<LOD	1,2	0,087	<LOQ	0,055	0,050	<LOD
51	Havel (UHW) km 16,4	S	23.3.2010	0,83	0,04	n. b.	0,79	<LOQ	<LOD	0,73	<LOQ	0,13	<LOQ	<LOQ	n. b.
52	Teltowkanal km 31,9	S	16.9.2009	0,94	0,10	n. b.	<b>0,94</b>	<b>0,10</b>	<b>n. b</b>	<b>2,0</b>	<b>0,13</b>	<b>0,32</b>	<b>0,068</b>	<b>0,10</b>	<b>n. b.</b>
53	Teltowkanal km 34, 4 #213	S	31.5.2010	0,95	0,13	0,39	0,97	0,21	<LOD	1,4	<LOQ	0,21	0,038	<LOD	<LOQ
54	Teltowkanal km 34,4 #45	S	16.12.2009	1,0	0,08	0,47	0,97	0,08	<LOD	2,5	0,11	0,40	0,063	0,10	<LOD
55	Teltowkanal km 32,4	S	16.9.2009	1,1	0,12	n. b.	<b>1,1</b>	<b>0,11</b>	<b>n. b</b>	<b>2,3</b>	<b>0,15</b>	<b>0,37</b>	<b>0,077</b>	<b>0,12</b>	<b>n. b.</b>
56	Teltowkanal km 34,4 #115	S	23.2.2010	1,4	0,13	0,56	1,3	0,11	<LOD	2,9	0,13	0,61	0,070	0,11	<LOQ
57	Teltowkanal km 34,6	S	12.8.2009	1,5	n. b.	n. b.	1,4	0,35	n. b.	2,6	0,14	0,32	0,092	0,12	n. b.
58	Neuenhagener Mühlenfließ	S	22.6.2009	2,0	0,39	1,35	1,9	0,28	<LOQ	3,5	0,17	0,51	0,10	0,14	0,17
59	Ablauf Klärwerk Lönigen (Nds.)	S	16.4.2009	1,2	n. b.	0,46	1,0	0,27	n. b.	1,2	0,08	0,18	0,043	0,08	n. b.
60	Ablauf Klärwerk Ruhleben	24h	26.5.2010	2,1	0,30	0,62	1,6	0,27	<LOD	1,7	0,07	0,25	0,042	<LOQ	0,33
61	Ablauf Klärwerk Stahnsdorf	24h	27.5.2010	2,2	0,38	1,5	1,8	0,38	<LOQ	3,2	0,10	0,33	0,076	0,074	<LOQ
62	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	19.5.2010	1,9	0,60	0,85	1,8	0,38	<LOD	3,0	0,10	0,46	0,073	0,078	0,20



Nr.	Bezeichnung	Typ	Datum	ELISA			LC-MS/MS								
				CBZ	Cetiri- zin	Kof- fein	CBZ	Cetirizin	Koffein	DiOH- CBZ	2-OH- CBZ	10-OH- CBZ	EP-CBZ	3-OH- CBZ	Ox- CBZ
63	Ablauf Klärwerk Münchehofe	24h	27.5.2010	2,3	0,31	0,96	1,8	0,28	<LOD	3,3	0,11	0,72	0,064	0,11	0,20
64	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	21.5.2010	2,2	0,32	0,68	1,8	0,34	<LOD	2,6	0,11	0,38	0,072	0,076	0,17
65	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	9.6.2010	2,3	0,45	0,83	1,8	0,42	<LOD	3,1	0,11	0,37	0,059	0,10	0,23
66	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	30.3.2010	2,1	0,49	0,81	1,9	0,43	<LOD	2,9	0,11	0,42	0,076	0,11	<LOQ
67	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	7.5.2010	1,9	0,52	0,71	1,9	0,50	<LOD	2,6	0,11	0,45	0,068	0,090	<LOQ
68	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	31.5.2010	2,1	0,26	0,74	1,9	0,39	<LOD	3,1	0,13	0,45	0,059	0,10	0,25
69	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	3.5.2010	2,1	0,72	0,82	1,9	0,68	<LOD	3,1	0,11	0,47	0,064	0,088	0,18
70	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	12.3.2010	1,9	0,25	1,0	1,9	0,22	<LOD	3,3	0,12	0,33	0,078	0,13	0,17
71	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	19.4.2010	2,1	0,65	0,88	1,9	0,63	<LOD	3,4	0,12	0,45	0,086	0,11	<LOQ
72	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	30.3.2010	1,9	0,55	0,88	1,9	0,44	<LOD	3,9	0,16	0,65	0,11	0,15	<LOQ
73	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	8.4.2010	2,2	0,55	0,91	2,0	0,50	<LOD	3,4	0,16	0,49	0,066	0,12	<LOQ
74	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	3.3.2010	2,2	0,14	1,0	2,0	0,22	<LOD	3,4	0,11	0,54	0,10	0,14	<LOQ
75	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	3.4.2010	2,0	0,54	0,94	2,0	0,43	<LOD	4,0	0,14	0,71	0,092	0,14	<LOQ
76	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	1.4.2010	2,1	0,59	0,91	2,0	0,45	<LOD	3,8	0,14	0,73	0,10	0,15	<LOD
77	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	23.3.2010	2,2	0,42	0,83	2,0	0,26	<LOD	2,7	0,10	0,34	0,058	0,08	<LOQ
78	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	5.4.2010	2,3	n. b.	0,85	2,1	0,49	<LOD	4,3	0,14	0,65	0,11	0,14	<LOQ
79	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	2h	7.4.2010	2,3	0,61	0,84	2,1	0,50	<LOD	4,4	0,16	0,76	0,11	0,16	<LOQ
80	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	2h	7.4.2010	2,5	0,59	0,94	2,1	0,51	<LOD	4,2	0,16	0,75	0,11	0,15	<LOQ
81	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	2h	7.4.2010	2,1	0,65	0,89	2,1	0,51	<LOD	4,6	0,18	0,81	0,12	0,15	<LOQ
82	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	28.3.2010	1,9	0,43	0,81	<b>2,2</b>	<b>0,46</b>	<b>0,24</b>	<b>3,9</b>	<b>0,20</b>	<b>0,66</b>	<b>0,12</b>	<b>0,17</b>	<b>0,06</b>
83	Ablauf Klärwerk Wansdorf	24h	27.5.2010	2,7	0,51	0,96	2,2	0,41	<LOD	3,8	0,17	0,44	0,07	0,14	<LOQ
84	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	10.2.2009	2,3	0,15	n. b.	2,2	0,16	n. b.	3,2	0,20	0,45	0,11	0,17	n. b.
85	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	7.4.2010	2,3	n. b.	1,0	<b>2,2</b>	<b>0,51</b>	<b>0,22</b>	<b>4,5</b>	<b>0,23</b>	<b>0,87</b>	<b>0,13</b>	<b>0,18</b>	<b>0,12</b>
86	Ablauf Klärwerk Schönerlinde	24h	21.5.2010	2,6	0,33	0,63	2,2	0,29	<LOD	2,3	0,10	0,39	0,057	0,087	0,39
87	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	2h	24.3.2010	2,7	0,39	0,91	2,4	0,36	<LOD	3,9	0,14	0,75	0,10	0,14	<LOD
88	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	2h	24.3.2010	2,6	0,27	0,94	2,4	0,35	<LOD	3,8	0,14	0,72	0,09	0,14	<LOD
89	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	2h	24.3.2010	2,6	0,31	0,83	2,4	0,35	<LOD	4,0	0,14	0,75	0,10	0,15	<LOD
90	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	26.3.2010	2,2	0,35	0,93	2,6	0,45	<LOD	4,4	0,16	0,76	0,12	0,16	<LOD
91	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	24.3.2010	2,8	n. b.	0,88	<b>2,6</b>	<b>0,40</b>	<b>0,23</b>	<b>4,8</b>	<b>0,30</b>	<b>1,13</b>	<b>0,15</b>	<b>0,24</b>	<b>&lt;LOD</b>
92	Ablauf Klärwerk Waßmannsdorf	S	17.3.2010	4,4	0,46	1,0	4,5	0,22	<LOD	3,4	0,17	0,35	0,094	0,17	<LOD
93	Zulauf Klärwerk Stahnsdorf	24h	27.5.2010	1,8	0,41	200	1,5	0,40	185	4,1	0,16	0,64	0,058	0,13	<LOD
94	Zulauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	21.5.2010	1,8	0,44	446	1,5	0,31	470	3,7	0,17	0,45	0,059	0,13	<LOD
95	Zulauf Klärwerk Schönerlinde	24h	21.5.2010	1,9	0,33	86	1,7	0,20	77	2,7	0,12	0,33	0,044	0,09	<LOD

Nr.	Bezeichnung	Typ	Datum	ELISA				LC-MS/MS					
				CBZ	Cetirizin	Kof- fein	CBZ	Cetirizin	Koffein	DiOH- CBZ	2-OH- CBZ	10-OH- CBZ	Ox- CBZ
96	Zulauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	7.4.2010	2,0	0,73	297	1,8	0,49	292	4,0	0,19	1,04	0,19
97	Zulauf Klärwerk Wandsdorf	24h	27.5.2010	2,2	0,45	226	1,9	0,41	192	4,4	0,23	0,37	0,18
98	Zulauf Klärwerk Münchehofe	24h	27.5.2010	2,0	0,63	150	2,1	0,17	142	4,2	0,17	0,53	0,14
99	Zulauf Klärwerk Waßmannsdorf	24h	24.3.2010	2,0	0,56	400	2,1	0,40	358	4,1	0,19	0,95	0,19
100	Zulauf Klärwerk Ruhleben	24h	25.5.2010	5,4	0,13	194	5,0	0,08	187	2,5	0,26	0,30	0,23

Tabelle 36: Analysenergebnissen von ELISA und LC-MS/MS der 24h-Mischproben aus den Zuläufen und Abläufen aus sechs Berliner Klärwerken; Angaben in µg / L, fett gedruckte Werte wurden nach Probenanreicherung mit SPE gewonnen

Klärwerk	Datum	ELISA			LC-MS/MS									
		CBZ	Cetiri- zin	Kof- fein	CBZ	Cetirizin	Koffein	DiOH- CBZ	2-OH- CBZ	10-OH- CBZ	EP-CBZ	3-OH- CBZ	Ox-CBZ	
Klärwerksablauf														
Münchehofe	27.5.2010	2,3	0,31	0,96	1,8	0,28	<LOD	3,3	0,11	0,72	0,064	0,11	0,20	
Ruhleben	26.5.2010	2,1	0,30	0,62	1,6	0,27	<LOD	1,7	0,071	0,25	0,042	<LOQ	0,33	
Schönerlinde	21.5.2010	2,6	0,33	0,63	2,2	0,29	<LOD	2,3	0,10	0,39	0,057	0,087	0,39	
Stahnsdorf	27.5.2010	2,2	0,38	1,5	1,8	0,38	<LOQ	3,2	0,10	0,33	0,076	0,074	<LOQ	
Wansdorf	27.5.2010	2,7	0,51	0,96	2,2	0,41	<LOD	3,8	0,17	0,44	0,068	0,14	<LOQ	
Waßmannsdorf	24.3.2010	2,8	n. b.	0,88	<b>2,6</b>	<b>0,40</b>	<b>0,23</b>	<b>4,8</b>	<b>0,30</b>	<b>1,1</b>	<b>0,15</b>	<b>0,24</b>	<b>&lt;LOD</b>	
Waßmannsdorf	7.4.2010	2,3	n. b.	1,0	<b>2,2</b>	<b>0,51</b>	<b>0,22</b>	<b>4,5</b>	<b>0,23</b>	<b>0,87</b>	<b>0,13</b>	<b>0,18</b>	<b>0,12</b>	
Waßmannsdorf	21.5.2010	2,2	0,32	0,68	1,8	0,34	<LOD	2,6	0,11	0,38	0,072	0,076	0,17	
Klärwerkszulauf														
Münchehofe	27.5.2010	2,0	0,63	150	2,1	0,17	140	4,2	0,17	0,53	0,041	0,14	<LOD	
Ruhleben	25.5.2010	5,4	0,13	190	5,0	0,076	190	2,5	0,26	0,30	<LOQ	0,23	<LOD	
Schönerlinde	21.5.2010	1,9	0,33	86	1,7	0,20	77	2,7	0,12	0,33	0,044	0,094	<LOD	
Stahnsdorf	27.5.2010	1,8	0,41	200	1,5	0,40	190	4,1	0,16	0,64	0,058	0,13	<LOD	
Wansdorf	27.5.2010	2,2	0,45	230	1,9	0,41	190	4,4	0,23	0,37	0,058	0,18	<LOD	
Waßmannsdorf	24.3.2010	2,0	0,56	400	2,1	0,40	360	4,1	0,19	0,95	0,075	0,19	0,17	
Waßmannsdorf	7.4.2010	2,0	0,73	300	1,8	0,49	290	4,0	0,19	1,0	0,081	0,19	<LOD	
Waßmannsdorf	21.5.2010	1,8	0,44	450	1,5	0,31	470	3,7	0,17	0,45	0,059	0,13	<LOD	

Tabelle 37 Analyseergebnisse von ELISA und LC-MS/MS der 2h- und 24h-Mischproben aus dem Ablauf des Klärwerks Waßmannsdorf, Angaben in µg/L, fett gedruckte Werte wurden vor der Analyse mit SPE angereichert.

Datum	ELISA			LC-MS/MS									
	CBZ	Cetirizin	Koffein	CBZ	Cetirizin	Koffein	DiOH-CBZ	2-OH-CBZ	10-OH-CBZ	EP-CBZ	3-OH-CBZ	Ox-CBZ	
24h-Mischproben													
24.3.2010	2,8		0,88	2,6	0,40	0,23	4,8	0,30	1,1	0,15	0,24	<LOD	
26.3.2010	2,2	0,35	0,93	2,6	0,45	<LOD	4,4	0,16	0,76	0,12	0,16	<LOD	
28.3.2010	1,9	0,43	0,81	2,2	0,46	0,24	3,9	0,20	0,66	0,12	0,17	0,062	
30.3.2010	1,9	0,55	0,88	1,9	0,44	<LOD	3,9	0,16	0,65	0,11	0,15	<LOQ	
1.4.2010	2,1	0,59	0,91	2,0	0,45	<LOD	3,8	0,14	0,73	0,097	0,15	<LOD	
3.4.2010	2,0	0,54	0,94	2,0	0,43	<LOD	4,0	0,14	0,71	0,092	0,14	<LOQ	
5.4.2010	2,3		0,85	2,1	0,49	<LOD	4,3	0,14	0,65	0,11	0,14	<LOQ	
7.4.2010	2,3		1,0	2,2	0,51	0,22	4,5	0,23	0,87	0,13	0,18	0,12	
2h-Mischproben													
24.3. 0-2 Uhr	2,8	0,11	0,95										
24.3. 2-4 Uhr	2,2	0,60	0,93										
24.3. 4-6 Uhr	2,6	0,31	0,83	2,4	0,35	<LOD	4,0	0,14	0,75	0,096	0,15	<LOD	
24.3. 6-8 Uhr	2,5	0,25	0,85										
24.3. 8-10 Uhr	2,8	0,42	0,90										
24.3. 10-12 Uhr	2,6	0,27	0,94	2,4	0,35	<LOD	3,8	0,14	0,72	0,088	0,14	<LOD	
24.3. 12-14 Uhr	2,6	0,50	0,94										
24.3. 14-16 Uhr	2,7	0,61	0,95										
24.3. 16-18 Uhr	2,7	0,39	0,91	2,4	0,36	<LOD	3,9	0,14	0,75	0,098	0,14	<LOD	
24.3. 18-20 Uhr	2,5	0,39	0,95										
24.3. 20-22 Uhr	2,7	0,49	0,88										
24.3. 22-24 Uhr	2,5	0,43	0,84										
7.4. 0-2 Uhr	2,2	0,49	1,0										
7.4. 2-4 Uhr	2,4	0,60	0,91										
7.4. 4-6 Uhr	2,4	0,36	0,92										
7.4. 6-8 Uhr	2,5	0,59	0,94	2,1	0,51	<LOD	4,2	0,16	0,75	0,11	0,15	<LOQ	
7.4. 8-10 Uhr	2,7	0,54	0,82										
7.4. 10-12 Uhr	2,2	0,46	0,95										

Datum	ELISA			LC-MS/MS								
	CBZ	Cetirizin	Koffein	CBZ	Cetirizin	Koffein	DiOH-CBZ	2-OH-CBZ	10-OH-CBZ	EP-CBZ	3-OH-CBZ	Ox-CBZ
7.4. 12-14 Uhr	2,3	0,61	0,84	2,1	0,50	<LOD	4,4	0,16	0,76	0,11	0,16	<LOQ
7.4. 14-16 Uhr	2,1	0,65	0,89	2,1	0,51	<LOD	4,6	0,18	0,81	0,12	0,15	<LOQ
7.4. 16-18 Uhr	2,3	0,70	0,96									
7.4. 18-20 Uhr	2,2	0,65	1,1									
7.4. 20-22 Uhr	2,2	0,54	0,97									
7.4. 22-24 Uhr	2,4	0,69	0,92									

Tabelle 38: Carbamazepin-Gehalt in Trinkwasserproben aus dem Berliner Stadtgebiet, bestimmt mit ELISA (n = 2) und LC-MS/MS (n = 1), alle Konzentrationsangaben in µg/L

Nr.	Datum	CBZ-Gehalt		Adresse	Dezimalkoordinaten	
		ELISA	LC-MS/MS		Nord	Ost
1	4.1.2010	<0,025	<LOQ	Gürtelstr, 32/32a	52,5448	13,4516
2	4.1.2010	<0,025		Diesterwegstr, 10	52,5393	13,4273
3	4.1.2010	0,027		Ullsteinstr, 159	52,4521	13,3810
4	4.1.2010	0,11	0,100	Jagowstr, 31-34	52,5227	13,3339
5	4.1.2010	0,093	0,092	Gorkistr, 127	52,5916	13,3024
6	5.1.2010	<0,025		Berliner Allee 193-197	52,5553	13,4675
7	5.1.2010	0,11	0,12	Gartenstr, 107a	52,5297	13,3923
8	5.1.2010	0,11	0,10	Brüsseler Str, 31	52,5451	13,3465
9	5.1.2010	0,079	0,068	Edinburger Str, 7	52,5534	13,3529
10	5.1.2010	0,116	0,098	Reinickendorfer Str, 61	52,5556	13,3657
11	5.1.2010	<0,025		Bernauer Str, 115-118	52,5345	13,3890
12	5.1.2010	<0,025		Ackerstr, 136-137	52,5360	13,3890
13	5.1.2010	0,093		Witzlebenstr, 34-35	52,5092	13,2943
14	5.1.2010	<0,025		Friederikestr, 34	52,5697	13,2292
15	5.1.2010	<0,025		Rohrweiherstr, 15	52,5870	13,2228
16	5.1.2010	<0,025		Am Vierrutenberg 59-64	52,6175	13,3396
17	5.1.2010	<0,025		Rothenbücherweg 27	52,4926	13,1820
18	5.1.2010	<0,025		Mascha-Kaleko-Weg 3	52,4566	13,1547
19	5.1.2010	0,031		Königstr, 25-27	52,4191	13,1544
20	5.1.2010	0,035		Spanische Allee 8	52,4305	13,2224
21	5.1.2010	<0,025		Salvador-Allende-Str, 2-8	52,4410	13,5936
22	6.1.2010	<0,025		Havelschanze 1,3,5	52,5540	13,2081
23	6.1.2010	<0,025		Staakener Str, 23	52,5360	13,1818
24	6.1.2010	<0,025		An der Havelspitze 3	52,5556	13,2180
25	6.1.2010	<0,025		Lutoner Str, 15-19	52,5273	13,1713
26	6.1.2010	0,025		Rosenheimer Str, 20b	52,4905	13,3414
27	6.1.2010	0,031		Kolonnenstr, 30	52,4851	13,3685
28	6.1.2010	0,044		Zietenstr, 4 und 6	52,4998	13,3575
29	6.1.2010	0,057		Belziger Str, 53C	52,4856	13,3489
30	6.1.2010	<0,025		Eschengraben 36-42	52,5562	13,4213
31	6.1.2010	<0,025		Schonensche Str, 25	52,5539	13,4218
32	6.1.2010	<0,025		Alt-Tegel 40	52,5882	13,2766
33	7.1.2010	<0,025		Pappelallee 61	52,5459	13,4176
34	7.1.2010	<0,025		Brunsbütteler Damm 431	52,5343	13,1381
35	7.1.2010	0,044	0,031	Meinekestr, 14	52,4998	13,3291
36	7.1.2010	<0,025		Kurhausstr, 30-35	52,6236	13,2976
37	7.1.2010	<0,025		Fürst-Bismarck-Str, 2-10	52,6082	13,3133
38	7.1.2010	0,038		Spechtstr, 2-4	52,4615	13,2774
39	7.1.2010	0,034		Wilskistr, 75	52,4466	13,2478
40	7.1.2010	0,036		Auf dem Grat 3	52,4560	13,2741
41	7.1.2010	0,037		Riemeisterstr, 23	52,4419	13,2617
42	7.1.2010	0,04		Am kleinen Wannsee 5	52,4189	13,1640
43	11.1.2010	<0,025		Caspar-Theyß-Str, 29	52,4915	13,2910
44	11.1.2010	0,035		Alemannenstr, 10	52,4319	13,1948
45	11.1.2010	0,031		Tirschenreuther Ring 69	52,4097	13,3551
46	11.1.2010	0,057	0,042	Leykestr, 11-13	52,4752	13,4305
47	11.1.2010	<0,025		Hauptstr, 16	52,6181	13,3886
48	12.1.2010	<0,025		Werlseestr, 39	52,4531	13,6358
49	12.1.2010	<0,025		Liebenwalder Str, 24	52,5384	13,4992

Nr.	Datum	CBZ-Gehalt		Adresse	Dezimalkoordinaten	
		ELISA	LC-MS/MS		Nord	Ost
50	12.1.2010	<0,025		Woldegker Str, 21	52,5737	13,5126
51	12.1.2010	<0,025		Kiekemaler Str, 7	52,4732	13,6060
52	12.1.2010	<0,025		Alt-Lietzow 33	52,5184	13,3119
53	12.1.2010	<0,025		Gimpelsteig 3	52,4245	13,2561
54	12.1.2010	<0,025		Jungfernstieg 18	52,4324	13,3292
55	12.1.2010	<0,025		Bogenstr, 9-14	52,4339	13,2621
56	12.1.2010	<0,025		Pinnauweg 15-17	52,4212	13,2786
57	12.1.2010	<0,025		Berner Str, 2-3	52,4323	13,2927
58	13.1.2010	0,062		Hohenzollerndamm 45	52,4884	13,3040
59	13.1.2010	0,031		Kurfürstendamm 126/127	52,4950	13,2860
60	13.1.2010	0,046		Olivaer Platz 3	52,4991	13,3137
61	13.1.2010	0,044		Wilhelmsaue 118	52,4853	13,3236
62	13.1.2010	<0,025		Bundesallee 33	52,4899	13,3308
63	13.1.2010	0,033		Ludwigkirchplatz 3	52,4980	13,3212
64	13.1.2010	0,053		Sächsische Str, 46	52,4916	13,3169
65	14.1.2010	0,036		Bismarckstr, 33	52,5119	13,3095
66	14.1.2010	<0,025		Pfingstberggasse 6	52,4398	13,5435
67	14.1.2010	<0,025		Rudower Str, 60	52,4427	13,5630
68	14.1.2010	<0,025		Bruno-Bürgel-Weg 122-140	52,4518	13,5556
69	14.1.2010	0,025		Otto-Krüger-Zeile 4-6	52,4669	13,5079
70	14.1.2010	<0,025		Bahnhofstr, 32	52,5914	13,4517
71	14.1.2010	<0,025		Finsterwalder Str, 52-54	52,6009	13,3430
72	14.1.2010	<0,025		Sigismundkorso 68-70	52,6302	13,2770
73	14.1.2010	0,03		Bergstr, 90	52,4581	13,3291
74	14.1.2010	0,037		Liliencronstr, 15	52,4490	13,3410
75	14.1.2010	0,051		Lutherstr, 7	52,4500	13,3284
76	14.1.2010	0,045		Gardeschützenweg 17	52,4489	13,3132
77	15.1.2010	0,13	0,098	Melchiorstr, 20-22	52,5072	13,4223
78	15.1.2010	0,096	0,081	Michaelkirchstr, 19	52,5093	13,4208
79	15.1.2010	0,11	0,087	Wallstr, 70-73	52,5112	13,4061
80	15.1.2010	0,086	0,064	Wartenburgstr, 6	52,4956	13,3809
81	15.1.2010	0,112		Stallschreiberstr, 12	52,5057	13,4088
82	15.1.2010	0,066		Hasenheide 1-4	52,4866	13,4240
83	15.1.2010	0,072		Mehringplatz 15	52,4986	13,3927
84	15.1.2010	0,097		Friedrichstr, 34	52,5052	13,3908
85	15.1.2010	0,13	0,11	Max-Dohrn-Str, 8	52,5309	13,2991
86	15.1.2010	0,052		Dardanellenweg 52	52,4449	13,4092
87	15.1.2010	0,057	0,029	Alt-Tempelhof 10-12	52,4661	13,3877
88	15.1.2010	0,044		Albulaweg 17	52,4234	13,4001
89	15.1.2010	0,045		Stegerwaldstr, 50	52,4211	13,3681
90	15.1.2010	0,05		Bayernring 43-44	52,4817	13,3849
91	15.1.2010	<0,025		Tempelhofer Damm 165	52,4631	13,3855
92	15.1.2010	0,041		Donaustr, 29-34	52,4821	13,4362
93	15.1.2010	0,035		Karl-Marx-Str, 197	52,4718	13,4413
94	15.1.2010	<0,025		Zur Nachtheide 137	52,4266	13,5909
95	15.1.2010	<0,025		Dregerhoffstr, 66	52,4293	13,5953
96	15.1.2010	0,033		Fürstenwalder Allee 182	52,4343	13,7053
97	15.1.2010	<0,025		Fürstenwalder Allee 344	52,4314	13,7191
98	15.1.2010	<0,025		Salvador-Allende-Str, 91	52,4451	13,5936
99	18.1.2010	0,15	0,13	Heinickeweg 15	52,5385	13,2844
100	18.1.2010	0,043		Rudower Str, 45	52,4440	13,5637
101	18.1.2010	0,039		Springbornstr, 88	52,4382	13,4980
102	18.1.2010	0,041	<LOQ	Venusstr, 28	52,4059	13,5275

Nr.	Datum	CBZ-Gehalt		Adresse	Dezimalkoordinaten	
		ELISA	LC-MS/MS		Nord	Ost
103	18.1.2010	0,039		Buntzelstr, 56	52,4038	13,5704
104	18.1.2010	0,03		Schloßallee 3	52,5813	13,4199
105	18.1.2010	0,054		Mariendorfer Weg 74	52,4643	13,4301
106	18.1.2010	0,059		Kirchhofstr, 23	52,4693	13,4386
107	18.1.2010	0,06		Neuköllnische Allee 146	52,4625	13,4705
108	18.1.2010	0,056		Aronsstr, 134	52,4720	13,4660
109	18.1.2010	0,069	0,041	Teichstr, 44	52,5675	13,3467
110	18.1.2010	0,045		Motzener Str, 40	52,3976	13,3819
111	19.1.2010	0,026		Lindenberger Weg 26	52,6313	13,5028
112	19.1.2010	0,036		Mühlenbecker Str, 28	52,6558	13,4366
113	19.1.2010	0,045		Buckower Damm 31-41	52,4411	13,4349
114	19.1.2010	<0,025		Mellenseestr, 65	52,4950	13,5129
115	19.1.2010	0,029		Darßer Str, 103	52,5644	13,4920
116	19.1.2010	<0,025		Kaskelstr./Hauffstr,	52,5037	13,4820
117	19.1.2010	0,037		Harnackstr, 7-9	52,5110	13,4875
118	19.1.2010	0,03		Fanninger Str, 32	52,5143	13,4951
119	19.1.2010	0,035		Degner Str, 22	52,5475	13,4957
120	19.1.2010	0,038		Gensinger Str, 103	52,5111	13,5336
121	19.1.2010	0,032		Warnitzer Str, 9	52,5663	13,5172
122	19.1.2010	0,031		Dorfstr, 37	52,5786	13,4830
123	19.1.2010	0,039		Wernerstr, 11	52,4834	13,2739
124	19.1.2010	0,059		Offenbacher Str, 5a	52,4751	13,3203
125	19.1.2010	0,081		Albestr, 31	52,4734	13,3333
126	19.1.2010	0,074		Steinmetzstr, 79	52,4994	13,3646
127	19.1.2010	0,054		Mohriner Allee 50	52,4422	13,4271
128	19.1.2010	0,056		Cafeastr, 17	52,4539	13,4187
129	19.1.2010	0,051		Buckower Damm 176	52,4276	13,4349
130	19.1.2010	0,046		Waltersdorfer Chaussee 162	52,4025	13,5124
131	20.1.2010	0,066		Elsenstr, 87-96	52,4876	13,4521
132	20.1.2010	0,028		Weiskopffstr, 12	52,4576	13,5416
133	20.1.2010	0,07		Rathausstr, 15	52,5188	13,4079
134	20.1.2010	0,029		Weinbergsweg 14	52,5330	13,4042
135	20.1.2010	0,026		Barnimstr, 18	52,5261	13,4225
136	20.1.2010	0,049		Hindenburgdamm 137	52,4321	13,3102
137	20.1.2010	0,053		Paulsenstr, 3-4	52,4609	13,3112
138	20.1.2010	<0,025		Kaulsdorfer Str, 313	52,4611	13,5786
139	20.1.2010	<0,025		Peter-Hille-Str, 26	52,4537	13,6215
140	20.1.2010	0,037		Fürstenwalder Allee 1	52,4428	13,6860
141	20.1.2010	<0,025	<LOQ	Grabensprung 29	52,5068	13,5527
142	20.1.2010	0,043		Schönewalder Str, 9	52,5321	13,6189
143	21.1.2010	0,15	0,12	Invalidenstr, 60	52,5244	13,3626
144	21.1.2010	<0,025		Lauchhammerstr, 24	52,4961	13,5478
145	21.1.2010	0,029		H.-Weigel-Platz 10	52,5265	13,5407
146	21.1.2010	0,038		Buckower Ring 62	52,5257	13,5728
147	21.1.2010	<0,025		Köpenicker Str, 302	52,4749	13,5592
148	21.1.2010	0,038		Hellersdorfer Str, 27	52,5164	13,5893
149	21.1.2010	0,041		Finkelsteinstr, 6-8	52,5197	13,5991
150	21.1.2010	0,035		Greifswalder Str, 90	52,5439	13,4423
151	21.1.2010	0,027		Laskerstr, 6-8	52,5014	13,4657
152	21.1.2010	0,084		Stargardtstr, 12-14	52,5659	13,3588
153	21.1.2010	0,151		General-Woyna Str, 48	52,5729	13,3185
154	21.1.2010	0,056		Cunostr, 74	52,4813	13,2958
155	22.1.2010	<0,025		Holzmarktstr, 51	52,5135	13,4245

Nr.	Datum	CBZ-Gehalt		Adresse	Dezimalkoordinaten	
		ELISA	LC-MS/MS		Nord	Ost
156	22.1.2010	<0,025		Bänschstr, 78	52,5174	13,4694
157	22.1.2010	<0,025		Bahnhofstr, 17	52,6120	13,4745
158	22.1.2010	<0,025		Langhansstr, 37	52,5517	13,4409
159	22.1.2010	<0,025		Wilhelm-Kuhr-Str, 78	52,5688	13,3969
160	22.1.2010	<0,025		Pfarrer-Lenzel-Str, 1-5	52,5883	13,3964
161	22.1.2010	<0,025		Heinrich-Mann-Str, 31	52,5725	13,3941
162	22.1.2010	0,026		Wutzkyallee 65	52,4236	13,4734
163	22.1.2010	<0,025		Schleusinger Str, 14	52,5584	13,5645
164	25.1.2010	<0,025		Alt-Buch 50	52,6363	13,5023
165	25.1.2010	0,047		Welserstr, 14	52,4975	13,3419
166	25.1.2010	0,04		Bayernallee 49/50	52,5099	13,2679
167	25.1.2010	0,031		Kirchhainer Damm 46	52,3826	13,4133
168	25.1.2010	0,029		An der Dorfkirche 5	52,4132	13,3674
169	25.1.2010	<0,025		Letteallee 39-41	52,5632	13,3704
170	26.1.2010	0,12		Platz der Republik 1	52,5192	13,3749
171	27.1.2010	<0,025		Kissingenstr, 5-6	52,5663	13,4152
172	27.1.2010	<0,025		Südekumzeile 3	52,5313	13,1580
173	28.1.2010	<0,025		Rudolf-Mosse-Str, 9-11	52,4750	13,3042
174	28.1.2010	<0,025		Roelckestr, 117	52,5594	13,4552
175	28.1.2010	0,15		Eichborndamm 215-239	52,5882	13,3245
176	28.1.2010	0,068		Ruppiner Chaussee 268	52,6186	13,2404
177	28.1.2010	0,033		Neue Kreisstr, 1	52,3963	13,1358
178	29.1.2010	0,15		Unionplatz 12	52,5330	13,3376
179	29.1.2010	0,14		Unter den Linden 77	52,5167	13,3811



Tabelle 39: Gehalt an CBZ, Cetirizin und Koffein in Schöpfproben aus Oberflächengewässern, die zwischen 2008 und 2010 in Berlin gesammelt wurden. Bestimmung mit ELISA, alle Angaben in µg/L

Datum	Gewässer	CELISA			C <sub>LC-MS/MS</sub> CBZ	Dezimalkoordinaten	
		CBZ	Cetirizin n	Koffein		Nord	Ost
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,090	n. b.	0,14	0,072	52,5273	13,3741
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,090	n. b.	0,15	n. b.	52,5310	13,3708
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,087	n. b.	0,11	n. b.	52,5343	13,3678
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,093	n. b.	0,12	n. b.	52,5367	13,3643
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,096	n. b.	0,14	n. b.	52,5382	13,3589
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,092	n. b.	0,17	n. b.	52,5393	13,3536
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,089	n. b.	0,14	n. b.	52,5385	13,3475
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,091	n. b.	0,14	n. b.	52,5390	13,3426
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,092	n. b.	0,31	0,069	52,5400	13,3375
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,088	n. b.	0,17	n. b.	52,5410	13,3322
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,079	n. b.	0,17	0,063	52,5398	13,3292
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,092	n. b.	0,16	n. b.	52,5376	13,3298
7.4.2010	Berlin-Spandauer Schiff.kanal	0,096	n. b.	0,14	0,073	52,5365	13,3333
7.7.2008	Britzer Verbindungskanal	0,42	n. b.	n. b.	n. b.	52,4666	13,4955
1.10.2008	Britzer Verbindungskanal	0,21	n. b.	0,57	n. b.	52,4592	13,4607
1.10.2008	Britzer Verbindungskanal	0,13	n. b.	0,10	n. b.	52,4591	13,4664
22.6.2009	Dahme	0,041	n. b.	0,064	n. b.	52,4337	13,5757
25.3.2010	Dahme	0,045	n. b.	n. b.	n. b.	52,4176	13,5833
5.7.2010	Dahme	0,12	0,025	0,12	n. b.	52,4439	13,5713
5.7.2010	Dahme	0,18	0,050	0,12	n. b.	52,4376	13,5749
5.7.2010	Dahme	0,24	0,069	0,67	n. b.	52,4330	13,5746
5.7.2010	Dahme	0,18	0,030	0,12	n. b.	52,4281	13,5761
5.7.2010	Dahme	0,16	0,030	0,11	n. b.	52,4228	13,5813
5.7.2010	Dahme	0,16	<LOQ	0,084	n. b.	52,4159	13,5843
5.7.2010	Dahme	0,082	<LOQ	0,10	n. b.	52,4130	13,5934
5.7.2010	Dahme	0,064	<LOQ	0,084	n. b.	52,4115	13,6045
5.7.2010	Dahme	0,039	<LOQ	0,091	n. b.	52,4100	13,6157
5.7.2010	Dahme	0,065	<LOQ	0,086	n. b.	52,4071	13,6242
5.7.2010	Dahme	0,053	<LOQ	0,10	n. b.	52,4015	13,6309
5.7.2010	Dahme	0,078	<LOQ	0,088	n. b.	52,3956	13,6379
5.7.2010	Dahme	0,038	<LOQ	0,078	n. b.	52,3879	13,6439
5.7.2010	Dahme	0,071	<LOQ	0,065	n. b.	52,3811	13,6523
5.7.2010	Dahme	0,057	<LOQ	0,072	n. b.	52,3766	13,6620
5.7.2010	Dahme(Gosener Kanal)	<LOQ	<LOQ	0,11	n. b.	52,4152	13,7202
5.7.2010	Dahme(Seddinsee)	0,066	<LOQ	0,060	n. b.	52,3806	13,6740
5.7.2010	Dahme(Seddinsee)	0,040	<LOQ	0,077	n. b.	52,3885	13,6860
5.7.2010	Dahme(Seddinsee)	0,038	<LOQ	0,11	n. b.	52,3968	13,6986
12.12.2009	Landwehrkanal	0,078	n. b.	3,3	n. b.	52,5002	13,3777
12.12.2009	Landwehrkanal	0,084	n. b.	0,12	n. b.	52,4977	13,3900
12.12.2009	Landwehrkanal	0,11	n. b.	0,45	n. b.	52,4972	13,3993
12.12.2009	Landwehrkanal	0,10	n. b.	0,39	n. b.	52,4952	13,4131
12.12.2009	Landwehrkanal	0,12	n. b.	0,70	n. b.	52,4955	13,4229
12.12.2009	Landwehrkanal	0,18	n. b.	1,8	n. b.	52,4910	13,4368
12.12.2009	Landwehrkanal	0,12	n. b.	0,86	n. b.	52,4917	13,4410
12.12.2009	Landwehrkanal	0,12	n. b.	0,82	n. b.	52,4960	13,4465
12.12.2009	Landwehrkanal	0,12	n. b.	0,88	n. b.	52,4977	13,4542
12.12.2009	Landwehrkanal	0,12	n. b.	0,89	n. b.	52,4965	13,4498
12.12.2009	Landwehrkanal	0,11	n. b.	0,88	n. b.	52,4871	13,4404
12.12.2009	Landwehrkanal	0,088	n. b.	0,12	n. b.	52,4825	13,4494

Datum	Gewässer	CELISA			C <sub>LC-MS/MS</sub> CBZ	Dezimalkoordinaten	
		CBZ	Cetirizin n	Koffein		Nord	Ost
22.6.2009	Neuenhagener Mühlenfließ	2,0	0,39	1,3	1,9	52,4801	13,6368
22.6.2009	Neuenhagener Mühlenfließ	0,13	n. b.	0,36	n. b.	52,4872	13,6448
16.6.2009	Oberhavel	0,33	0,037	0,12	0,33	52,5440	13,2103
23.9.2009	Oberhavel	0,43	0,031	n. b.	0,41	52,5440	13,2103
8.12.2009	Oberhavel	0,045	n. b.	n. b.	n. b.	52,5731	13,2240
8.12.2009	Oberhavel	0,12	n. b.	n. b.	n. b.	52,5553	13,2236
25.3.2010	Oberhavel	0,083	n. b.	n. b.	n. b.	52,5640	13,2257
25.3.2010	Oberhavel	0,030	n. b.	n. b.	n. b.	52,5730	13,2241
25.3.2010	Oberhavel	0,033	n. b.	n. b.	n. b.	52,6072	13,2010
25.3.2010	Oberhavel	0,036	n. b.	n. b.	n. b.	52,6330	13,2159
24.11.2009	Oberhavel (Tegeler See)	0,74	n. b.	n. b.	0,66	52,5753	13,2620
7.12.2009	Oberhavel (Tegeler See)	1,4	n. b.	n. b.	n. b.	52,5921	13,2784
7.7.2008	Spree	0,39	n. b.	n. b.	0,34	52,4729	13,4951
11.8.2008	Spree	0,52	0,10	0,37	0,45	52,4729	13,4951
16.6.2009	Spree	0,10	n. b.	0,48	n. b.	52,5369	13,2125
16.6.2009	Spree	0,081	n. b.	0,098	n. b.	52,5230	13,3412
16.6.2009	Spree	0,073	n. b.	0,093	n. b.	52,4966	13,4596
22.6.2009	Spree	0,092	n. b.	0,11	n. b.	52,4545	13,5550
16.9.2009	Spree	0,15	<LOQ	n. b.	0,14	52,4607	13,5129
23.9.2009	Spree	0,20	<LOQ	n. b.	0,19	52,5369	13,2126
23.9.2009	Spree	0,16	<LOQ	n. b.	0,16	52,5209	13,3065
6.4.2010	Spree	0,30	n. b.	0,25	0,26	52,4716	13,4963
6.4.2010	Spree	0,062	n. b.	0,19	n. b.	52,4752	13,4958
6.4.2010	Spree	0,11	n. b.	0,19	0,090	52,4794	13,4963
6.4.2010	Spree	0,062	n. b.	0,13	n. b.	52,4824	13,4959
6.4.2010	Spree	0,064	n. b.	0,14	n. b.	52,4855	13,4947
6.4.2010	Spree	0,086	n. b.	0,15	n. b.	52,4882	13,4916
6.4.2010	Spree	0,067	n. b.	0,14	n. b.	52,4899	13,4883
6.4.2010	Spree	0,061	n. b.	0,22	n. b.	52,4919	13,4840
6.4.2010	Spree	0,053	n. b.	0,32	n. b.	52,4942	13,4801
6.4.2010	Spree	0,053	n. b.	0,40	0,040	52,4957	13,4781
6.4.2010	Spree	0,059	n. b.	0,33	0,038	52,4972	13,4758
6.4.2010	Spree	0,068	n. b.	0,16	n. b.	52,4887	13,4832
6.4.2010	Spree	0,071	n. b.	0,16	n. b.	52,4895	13,4793
6.4.2010	Spree	0,078	n. b.	0,17	n. b.	52,4922	13,4735
6.4.2010	Spree	0,075	n. b.	0,16	n. b.	52,4937	13,4688
6.4.2010	Spree	0,072	n. b.	0,14	n. b.	52,4951	13,4653
6.4.2010	Spree	0,078	n. b.	0,14	n. b.	52,4963	13,4623
6.4.2010	Spree	0,093	n. b.	0,14	n. b.	52,4970	13,4602
6.4.2010	Spree	0,097	n. b.	0,19	0,071	52,4984	13,4560
6.4.2010	Spree	0,092	n. b.	0,16	n. b.	52,4994	13,4518
6.4.2010	Spree	0,084	n. b.	0,14	n. b.	52,5002	13,4495
6.4.2010	Spree	0,080	n. b.	0,15	n. b.	52,5014	13,4464
6.4.2010	Spree	0,078	n. b.	0,18	n. b.	52,5028	13,4434
6.4.2010	Spree	0,079	n. b.	0,18	n. b.	52,5040	13,4400
6.4.2010	Spree	0,068	n. b.	0,11	n. b.	52,5055	13,4368
6.4.2010	Spree	0,076	n. b.	0,13	n. b.	52,5073	13,4335
6.4.2010	Spree	0,070	n. b.	0,15	n. b.	52,5089	13,4305
6.4.2010	Spree	0,074	n. b.	0,14	n. b.	52,5105	13,4272
6.4.2010	Spree	0,080	n. b.	0,16	0,063	52,5119	13,4244
6.4.2010	Spree	0,076	n. b.	0,17	n. b.	52,5137	13,4203
6.4.2010	Spree	0,084	n. b.	0,17	n. b.	52,5145	13,4166
7.4.2010	Spree	0,087	n. b.	0,15	n. b.	52,5149	13,4103

Datum	Gewässer	CELISA			C <sub>LC-MS/MS</sub> CBZ	Dezimalkoordinaten	
		CBZ	Cetirizin n	Koffein		Nord	Ost
7.4.2010	Spree	0,097	n. b.	0,16	n. b.	52,5176	13,4035
7.4.2010	Spree	0,087	n. b.	0,082	n. b.	52,5211	13,3997
7.4.2010	Spree	0,088	n. b.	0,10	n. b.	52,5223	13,3941
7.4.2010	Spree	0,087	n. b.	0,21	n. b.	52,5218	13,3873
7.4.2010	Spree	0,087	n. b.	0,16	n. b.	52,5194	13,3815
7.4.2010	Spree	0,091	n. b.	0,13	n. b.	52,5209	13,3763
7.4.2010	Spree	0,091	n. b.	0,15	n. b.	52,5235	13,3723
5.7.2010	Spree	0,18	0,028	0,12	n. b.	52,4475	13,5726
16.7.2010	Spree	0,24	<LOQ	0,18	n. b.	52,4546	13,5583
16.7.2010	Spree	0,23	0,025	0,17	n. b.	52,4529	13,5678
16.7.2010	Spree	0,22	0,050	0,32	n. b.	52,4559	13,5487
16.7.2010	Spree	0,21	0,064	0,21	n. b.	52,4568	13,5389
16.7.2010	Spree	0,27	0,065	0,25	n. b.	52,4588	13,5199
16.7.2010	Spree	0,24	0,041	0,29	n. b.	52,4540	13,5239
5.7.2010	Spree(Großer Müggelsee)	0,050	<LOQ	0,068	n. b.	52,4390	13,6569
22.6.2009	Spree(Müggelspree)	0,032	n. b.	0,11	n. b.	52,4457	13,6162
23.3.2010	Spree(Müggelspree)	0,17	n. b.	n. b.	n. b.	52,4484	13,5855
25.3.2010	Spree(Müggelspree)	0,043	n. b.	n. b.	<LOQ	52,4262	13,7053
5.7.2010	Spree(Müggelspree)	0,43	0,12	0,22	n. b.	52,4486	13,6053
5.7.2010	Spree(Müggelspree)	0,44	0,071	3,3	n. b.	52,4497	13,5983
5.7.2010	Spree(Müggelspree)	0,50	0,088	0,24	n. b.	52,4497	13,5919
5.7.2010	Spree(Müggelspree)	0,46	0,093	0,31	n. b.	52,4481	13,5861
5.7.2010	Spree(Müggelspree)	0,44	0,084	0,49	n. b.	52,4477	13,5805
5.7.2010	Spree(Müggelspree)	0,48	0,089	0,43	n. b.	52,4487	13,5768
5.7.2010	Spree(Müggelspree)	<LOQ	<LOQ	0,11	n. b.	52,4300	13,6920
25.3.2010	Stölpchensee	0,61	0,038	n. b.	0,63	52,4049	13,1415
11.8.2008	Teltowkanal	2,6	0,14	0,72	2,4	52,4254	13,5419
11.8.2008	Teltowkanal	0,67	0,078	0,32	0,57	52,4595	13,4475
11.8.2008	Teltowkanal	2,2	0,13	0,74	1,8	52,4542	13,4600
1.10.2008	Teltowkanal	0,057	n. b.	0,15	n. b.	52,4268	13,5629
1.10.2008	Teltowkanal	1,2	n. b.	0,63	1,1	52,4333	13,4981
1.10.2008	Teltowkanal	1,3	n. b.	0,65	1,2	52,4363	13,4917
1.10.2008	Teltowkanal	1,3	n. b.	0,66	1,2	52,4403	13,4834
1.10.2008	Teltowkanal	1,2	n. b.	0,35	1,2	52,4423	13,4794
1.10.2008	Teltowkanal	1,4	n. b.	0,60	1,1	52,4464	13,4710
1.10.2008	Teltowkanal	1,3	n. b.	0,54	1,1	52,4508	13,4631
1.10.2008	Teltowkanal	0,98	n. b.	0,52	0,94	52,4540	13,4607
1.10.2008	Teltowkanal	0,97	n. b.	0,50	0,92	52,4587	13,4575
1.10.2008	Teltowkanal	0,043	n. b.	0,72	n. b.	52,4260	13,5559
1.10.2008	Teltowkanal	0,89	n. b.	0,54	0,84	52,4594	13,4490
1.10.2008	Teltowkanal	0,045	n. b.	0,12	n. b.	52,4297	13,5741
1.10.2008	Teltowkanal	0,050	n. b.	0,18	n. b.	52,4253	13,5478
1.10.2008	Teltowkanal	1,00	n. b.	0,49	0,91	52,4257	13,5377
1.10.2008	Teltowkanal	2,2	n. b.	1,1	2,3	52,4261	13,5286
1.10.2008	Teltowkanal	1,7	n. b.	0,89	1,5	52,4268	13,5182
1.10.2008	Teltowkanal	1,8	n. b.	0,63	1,4	52,4283	13,5090
1.10.2008	Teltowkanal	1,4	n. b.	0,81	1,4	52,4308	13,5032
2.6.2009	Teltowkanal	0,61	0,18	0,14	0,64	52,4263	13,5243
2.6.2009	Teltowkanal	0,041	n. b.	0,046	n. b.	52,4254	13,5419
9.6.2009	Teltowkanal	0,041	n. b.	0,037	0,032	52,4257	13,5514
9.6.2009	Teltowkanal	0,76	0,26	0,37	0,76	52,4308	13,3112
9.6.2009	Teltowkanal	0,61	n. b.	0,33	0,53	52,4372	13,3196
9.6.2009	Teltowkanal	0,50	0,12	0,17	0,47	52,4434	13,3261

Datum	Gewässer	CELISA			C <sub>LC-MS/MS</sub> CBZ	Dezimalkoordinaten	
		CBZ	Cetirizin	Koffein		Nord	Ost
9.6.2009	Teltowkanal	0,76	n. b.	0,43	0,67	52,3995	13,1836
9.6.2009	Teltowkanal	0,68	n. b.	0,64	0,61	52,3961	13,2077
9.6.2009	Teltowkanal	0,77	n. b.	0,61	0,69	52,3984	13,2277
16.9.2009	Teltowkanal	0,042	<LOQ	n. b.	0,037	52,4253	13,5480
16.9.2009	Teltowkanal	2,0	0,20	n. b.	2,0	52,4256	13,5282
16.9.2009	Teltowkanal	1,5	0,17	n. b.	1,5	52,4263	13,5243
16.9.2009	Teltowkanal	1,1	0,12	n. b.	1,1	52,4329	13,4990
16.9.2009	Teltowkanal	0,94	0,098	n. b.	0,94	52,4361	13,4922
16.9.2009	Teltowkanal	1,7	0,15	n. b.	1,7	52,4261	13,5287
16.9.2009	Teltowkanal	1,1	0,11	n. b.	1,1	52,4268	13,5180
16.9.2009	Teltowkanal	0,96	0,099	n. b.	0,93	52,4275	13,5122
16.9.2009	Teltowkanal	0,99	0,13	n. b.	0,96	52,4342	13,4960
25.3.2010	Teltowkanal	0,72	0,065	n. b.	0,74	52,4003	13,1422
6.7.2010	Teltowkanal	2,125	0,47	0,92	n. b.	52,4254	13,5419
6.7.2010	Teltowkanal	2,126	0,61	0,92	n. b.	52,4263	13,5243
16.6.2009	Unterhavel	0,14	0,034	0,51	n. b.	52,5119	13,2036
23.9.2009	Unterhavel	0,24	<LOQ	n. b.	0,24	52,5121	13,2029
23.3.2010	Unterhavel		n. b.	n. b.	n. b.	52,5121	13,2029
23.3.2010	Unterhavel	0,044	n. b.	0,79	0,79	52,4240	13,1001
16.6.2009	Unterhavel (Wannsee)	0,054	0,23	0,28	0,28	52,4295	13,1826
23.9.2009	Unterhavel (Wannsee)	0,033	n. b.	0,33	0,33	52,4220	13,1760
25.11.2009	Unterhavel (Wannsee)		n. b.	0,26	0,26	52,4316	13,1830
25.3.2010	Unterhavel (Wannsee)	0,037	n. b.	0,32	0,32	52,4210	13,1716

## 7 Literatur

- [1] Hignite C, Azarnoff DL. Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. *Life Sci.* 1977;20(2):337-41.
- [2] Stan HJ, Linkerhägner M. Identifizierung von 2-(4-Chlorphenoxy)-2-methylpropionsäure im Grundwasser mittels Kapillar-Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion und Massenspektrometrie. *Vom Wasser.* 1992;79:75-88.
- [3] Stan HJ, Heberer T, Linkerhägner M. Vorkommen von Clofibrinsäure im Gewässersystem – ist der humanmedizinische Gebrauch Ursache für die Kontamination von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser? *Vom Wasser.* 1994;83:57-68.
- [4] Heberer T, Butz S, Stan HJ. Analysis of Phenoxy-carboxylic Acids and Other Acidic Compounds in Tap, Ground, Surface and Sewage Water at the Low ng/L Level. *Int J Environ Anal Chem.* 1995;58:43-53.
- [5] Heberer T, Stan HJ. Determination of Clofibric Acid and N-(Phenylsulfonyl)-Sarcosine in Sewage, River and Drinking Water. *Int J Environ Anal Chem.* 1997;67(1-4):113-24.
- [6] Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 1998;32(11):3245-60.
- [7] Heberer T, Schmidt-Baumler K, Stan HJ. Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part 1: Drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and groundwater. *Acta hydrochim hydrobiol.* 1998;26(5):272-8.
- [8] Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 2002;36(6):1202-11.
- [9] Winker M, Tettenborn F, Faika D, Gulyas H, Otterpohl R. Comparison of analytical and theoretical pharmaceutical concentrations in human urine in Germany. *Water Res.* 2008;42(14):3633-40.
- [10] Kümmerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. *Chemosphere.* 2001;45(6-7):957-69.
- [11] Kümmerer K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *J Environ Manage.* 2009;90(8):2354-66.
- [12] Scheytt TJ, Mersmann P, Heberer T. Mobility of pharmaceuticals carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone in miscible-displacement experiments. *J Contam Hydrol.* 2006;83(1-2):53-69.
- [13] Bound JP, Voulvoulis N. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environ Health Perspect.* 2005;113(12):1705-11.
- [14] Fent K, Weston AA, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 2006;76(2):122-59.
- [15] Purdom CE, Hardiman PA, Bye VVJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chem Ecol.* 1994;8(4):275-85.
- [16] Pawlowski S, van Aerle R, Tyler CR, Braunbeck T. Effects of 17 alpha-ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004;57(3):330-45.
- [17] Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, et al. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol.* 2003;65(2):205-20.
- [18] Liu Z-h, Kanjo Y, Mizutani S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Sci Total Environ.* 2009;407(2):731-48.
- [19] Zhang Y, Geißen S-U, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere.* 2008;73(8):1151-61.
- [20] Triebkorn R, Casper H, Heyd A, Eikemper R, Köhler HR, Schwaiger J. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol.* 2004;68(2):151-66.
- [21] Kümmerer K. Resistance in the environment. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(2):311-20.
- [22] Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, et al. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature.* 2004;427(6975):630-3.
- [23] Schmitt-Jansen M, Bartels P, Adler N, Altenburger R. Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Anal Bioanal Chem.* 2007;387(4):1389-96.
- [24] Richtlinie 2000/60/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 23. Oktober 2000 zur Schaffung eines Ordnungsrahmens für Maßnahmen der Gemeinschaft im Bereich der Wasserpolitik. Amtsblatt der Europäischen Union L 327 (22.12.2000), S. 1-73.

- [25] Clara M, Strenn B, Kreuzinger N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Res.* 2004;38(4):947-54.
- [26] Umweltbundesamt. Carbamazepin und Koffein - Potenzielle Screeningparameter für Verunreinigungen des Grundwassers durch kommunales Abwasser. 2006.
- [27] Glassmeyer ST, Furlong ET, Kolpin DW, Cahill JD, Zaugg SD, Werner SL, et al. Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination. *Environ Sci Technol.* 2005;39(14):5157-69.
- [28] Godfrey E, Woessner WW, Benotti MJ. Pharmaceuticals in on-site sewage effluent and ground water, western Montana. *Ground Water.* 2007;45(3):263-71.
- [29] Katz BG, Griffin DW. Using chemical and microbiological indicators to track the impacts from the land application of treated municipal wastewater and other sources on groundwater quality in a karstic springs basin. *Environ Geol.* 2008;55(4):801-21.
- [30] Heberer T, Mechlinski A, Fanck B, Knappe A, Massmann G, Pekdeger A, et al. Field studies on the fate and transport of pharmaceutical residues in bank filtration. *Ground Water Monit R.* 2004;24(2):70-7.
- [31] Yu L, Fink G, Wintgens T, Melin T, Ternes TA. Sorption behavior of potential organic wastewater indicators with soils. *Water Res.* 2009;43(4):951-60.
- [32] Nakada N, Kiri K, Shinohara H, Harada A, Kuroda K, Takizawa S, et al. Evaluation of Pharmaceuticals and Personal Care Products as Water-soluble Molecular Markers of Sewage. *Environ Sci Technol.* 2008;42(17):6347-53.
- [33] Gasser G, Rona M, Voloshenko A, Shelkov R, Lev O, Elhanany S, et al. Evaluation of micropollutant tracers. II. Carbamazepine tracer for wastewater contamination from a nearby water recharge system and from non-specific sources. *Desalination.* 2010;273(2-3):398-404.
- [34] Cunningham VL, Perino C, D'Aco VJ, Hartmann A, Bechter R. Human health risk assessment of carbamazepine in surface waters of North America and Europe. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2010;56(3):343-51.
- [35] Ferrari B, Mons R, Vollat B, Fraysse B, Paxeus N, Lo Giudice R, et al. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ Toxicol Chem.* 2004;23(5):1344-54.
- [36] Oetken M, Nentwig G, Löffler D, Ternes T, Oehlmann J. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2005;49(3):353-61.
- [37] Osenbrück K, Glaser HR, Knoller K, Weise SM, Möder M, Wennrich R, et al. Sources and transport of selected organic micropollutants in urban groundwater underlying the city of Halle (Saale), Germany. *Water Res.* 2007;41(15):3259-70.
- [38] Tixier C, Singer HP, Öllers S, Müller SR. Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environ Sci Technol.* 2003;37(6):1061-8.
- [39] Sacher F, Ehmann M, Gabriel S, Graf C, Brauch HJ. Pharmaceutical residues in the river Rhine - results of a one-decade monitoring programme. *J Environ Mon.* 2008;10(5):664-70.
- [40] Öllers S, Singer HP, Fässler P, Müller SR. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *J Chromatogr A.* 2001;911(2):225-34.
- [41] Varenne A, Vessieres A, Salmay M, Durand S, Brossier P, Jaouen G. Quantitative analysis of mixtures of metal-carbonyl complexes by Fourier-transform infrared spectroscopy: Application to the simultaneous double immunoassay of antiepileptic drugs by the nonisotopic carbonyl metalloimmunoassay method. *Anal Biochem.* 1996;242(2):172-9.
- [42] Sidki AM, Landon J, Rowell F. Influence of the Hapten Fluorophore Bridge on Binding Parameters in a Fluoroimmunoassay for Carbamazepine. *Clin Chem.* 1984;30(8):1348-52.
- [43] Croci D, Nespolo A, Tarengi G. A Dry-Reagent Strip for Quantifying Carbamazepine Evaluated. *Clin Chem.* 1988;34(2):388-92.
- [44] Gagne F, Eullaffroy P, Blaise C. Development of a competitive enzymatic immunoassay for carbamazepine in biological tissues. *Fresen Environ Bull.* 2006;15(12A):1512-6.
- [45] Cochran EB, Massey KL, Phelps SJ, Cramer JA, Toftness BR, Denio LS, et al. Comparison of a Noninstrumented Immunoassay for Carbamazepine to High Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Polarization Immunoassay. *Epilepsia.* 1990;31(4):480-4.
- [46] Krämer PM, Li QX, Hammock BD. Integration of liquid chromatography with immunoassay: an approach combining the strengths of both methods. *J AOAC Int.* 1994;77(5):1275-87.
- [47] Womack EP, Valdes R, Jortani SA. Liquid Chromatography Combined with Immunoassay as a Reference Method for Analysis of Digitalis. In: Dasgupta A, editor. *Advances in Chromatographic Techniques for Therapeutic Drug Monitoring*. CRC Press; 2009. p. 153-62.

- 
- [48] Nielen MWF, Elliott CT, Boyd SA, Courtheyn D, Essers ML, Hooijerink HH, et al. Identification of an unknown beta-agonist in feed by liquid chromatography/bioassay/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry with accurate mass measurement. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(14):1633-41.
- [49] Guo Q, Gao GH, Qian SY, Mason RP. Novel identification of a sulfur-centered, radical-derived 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide nitron adduct formed from the oxidation of DTT by LC/ELISA, LC/electrospray ionization-MS, and LC/tandem MS. *Chem Res Toxicol*. 2004;17(11):1481-90.
- [50] Szymura-Oleksiak J, Wyska E, Wasieczko A. Pharmacokinetic interaction between imipramine and carbamazepine in patients with major depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001;154(1):38-42.
- [51] Sindrup SrH, Jensen TS. Pharmacologic treatment of pain in polyneuropathy. *Neurology*. 2000;55(7):915-20.
- [52] Anatomisch-therapeutisch-chemische Klassifikation mit Tagesdosen. Berlin: Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information; 2010 Verfügbar unter: <http://www.dimdi.de>. Zuletzt abgerufen am 20.6.2011.
- [53] Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 2009. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2009.
- [54] Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 2010. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2011.
- [55] McCorry D, Chadwick D, Marson A. Current drug treatment of epilepsy in adults. *Lancet Neurol*. 2004;3(12):729-35.
- [56] Shorvon SD. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The second 50 years, 1959–2009. *Epilepsia*. 2009;50:93-130.
- [57] National Institute for Clinical Excellence (NICE), 2004, The epilepsies: the diagnosis and management of the epilepsies in adults and children in primary and secondary care. Clinical Guideline 20. Verfügbar unter: [www.nice.org.uk/page.aspx?o=CG020NICEguideline](http://www.nice.org.uk/page.aspx?o=CG020NICEguideline). Zuletzt abgerufen am 27.01.2012.
- [58] French JA, Kanner AM, Bautista J, Abou-Khalil B, Browne T, Harden CL, et al. Efficacy and Tolerability of the New Antiepileptic Drugs, I: Treatment of New-Onset Epilepsy: Report of the TTA and QSS Subcommittees of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Epilepsia*. 2004;45(5):401-9.
- [59] Koch MW, Polman SK. Oxcarbazepine versus carbamazepine monotherapy for partial onset seizures. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2009(4):Art. No.: CD006453.
- [60] Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 1996. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 1997.
- [61] Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 1998. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 1999.
- [62] Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 2008. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2009.
- [63] Schwabe U, Paffrath D. Arzneiverordnungs-Report 2011. Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2011.
- [64] Health IIMS. IMS Midas Quantum Year End 2004.
- [65] WHO. Fact Sheet No. 999 - Epilepsy. 2009 Verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>. Zuletzt abgerufen am 27.01.2012.
- [66] Grzesiak AL, Lang M, Kim K, Matzger AJ. Comparison of the four anhydrous polymorphs of carbamazepine and the crystal structure of form I. *J Pharm Sci*. 2003;92(11):2260-71.
- [67] Lowes MMJ, Caira MR, Lotter AP, Van Watt JGD. Physicochemical properties and x-ray structural studies of the trigonal polymorph of carbamazepine. *J Pharm Sci*. 1987;76(9):744-52.
- [68] Reboul JP, Cristau B, Soyfer JC, Astier JP. 5H-Dibenz[b,f]azepinecarboxamide-5 (carbamazepine). *Acta Crystallogr B*. 1981;37(10):1844-8.
- [69] Lang M, Kampf JW, Matzger AJ. Form IV of carbamazepine. *J Pharm Sci*. 2002;91(4):1186-90.
- [70] Gagneux A. The chemistry of carbamazepine. In: Birkmayer W, editor. *Epileptic seizures - behaviour - pain*: University Park Press; 1976.
- [71] Wilhelm M, Kuhn R. Versuch einer stereochemisch-strukturellen Klassifizierung der Trizyklus-Psychopharmaka mit Einschluß der Dibenzo-bicyclooctadiene. *Pharmacopsychiatry*. 1970;3(6):317-32.
- [72] Bellucci G, Chiappe C, Marchetti F. Conformational process and symmetry in N-substituted 10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepine and 1a,10b-dihydro-6H-dibenzo[b,f]oxireno[d]azepine Derivatives. *Gazz Chim Ital*. 1995;125:341-6.
- [73] Dewar MJS, Trinajstić N. Ground states of conjugated molecules--XVIII : Azepines and oxepines. *Tetrahedron*. 1970;26(18):4269-76.
- [74] Faigle JW, Brechbühler S, Feldmann KF, Richter WJ. The biotransformation of carbamazepine. In: Birkmayer W, editor. *Epileptic seizures - behaviour - pain*: University Park Press; 1976. p. 127-40.
- [75] Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *Int J Pharm*. 2005;302(1-2):18-28.
- [76] Douroumis D, Bouropoulos N, Fahr A. Physicochemical characterization of solid dispersions of three antiepileptic drugs prepared by solvent evaporation method. *J Pharm Pharmacol*. 2007;59(5):645-53.
- [77] Tsinman K, Avdeef A, Tsinman O, Voloboy D. Powder Dissolution Method for Estimating Rotating Disk Intrinsic Dissolution Rates of Low Solubility Drugs. *Pharm Res*. 2009;26(9):2093-100.
- [78] Meylan WM, Howard PH, Boethling RS. Improved method for estimating water solubility from octanol/water partition coefficient. *Environ Toxicol Chem*. 1996;15(2):100-6.

- [79] Weiner IM. Mechanisms of Drug Absorption and Excretion The Renal Excretion of Drugs and Related Compounds. *Annu Rev Pharmacol.* 1967;7(1):39-56.
- [80] Faigle JW, Feldmann KF. Pharmacokinetic data of carbamazepine and its major metabolites in man. In: Schneider H, editor. *Clinical pharmacology of antiepileptic drugs*: Springer, Berlin 1975; 1975. p. 159-65.
- [81] Richter WJ, Kriemler P, Faigle JW. Newer aspects of the biotransformation of carbamazepine: structural characterization of highly polar metabolites. In: Frigerio A, editor. *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*. New York: Plenum Press; 1978. p. 1-14.
- [82] Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, Eadie MJ. Early stage autoinduction of carbamazepine metabolism in humans. *Eur J Clin Pharmacol.* 1994;47(4):355-60.
- [83] Bernus I, Hooper WD, Dickinson RG, Eadie MJ. Metabolism of carbamazepine and co-administered anticonvulsants during pregnancy. *Epilepsy Res.* 1995;21(1):65-75.
- [84] Morselli PL, Gerna M, Maio Dd, Zanda G, Viani F, Garattini S. Pharmacokinetic Studies on Carbamazepine in Volunteers and in Epileptic Patients. In: Schneider H, editor. *Clinical pharmacology of antiepileptic drugs*: Springer, Berlin; 1975. p. 166-80.
- [85] Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, Klein SM, Kroetz DL, Gonzalez FJ, et al. Human liver carbamazepine metabolism: Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(11):1969-79.
- [86] Kitteringham NR, Davis C, Howard N, Pirmohamed M, Park BK. Interindividual and interspecies variation in hepatic microsomal epoxide hydrolase activity: studies with cis-stilbene oxide, carbamazepine 10, 11-epoxide and naphthalene. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;278(3):1018-27.
- [87] Pearce RE, Vakkalagadda GR, Leeder JS. Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro I. Characterization of human cytochromes P450 responsible for the formation of 2-and 3-hydroxylated metabolites. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(11):1170-9.
- [88] Eichelbaum M, Köthe KW, Hoffmann F, Unruh GE. Use of stable labelled carbamazepine to study its kinetics during chronic carbamazepine treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 1982;23(3):241-4.
- [89] Ju C, Uetrecht JP. Detection of 2-Hydroxyiminostilbene in the Urine of Patients Taking Carbamazepine and Its Oxidation to a Reactive Iminoquinone Intermediate. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288(1):51-6.
- [90] Furst SM, Uetrecht JP. Carbamazepine metabolism to a reactive intermediate by the myeloperoxidase system of activated neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(6):1267-75.
- [91] Furst SM, Sukhai P, McClelland RA, Uetrecht JP. Covalent binding of carbamazepine oxidative metabolites to neutrophils. *Drug Metab Dispos.* 1995;23(5):590-4.
- [92] Bauer JE, Gerber N, Lynn RK, Smith RG, Thompson RM. A new N-glucuronide metabolite of carbamazepine. *Cell Mol Life Sci.* 1976;32(8):1032-3.
- [93] Maggs JL, Pirmohamed M, Kitteringham NR, Park BK. Characterization of the metabolites of carbamazepine in patient urine by liquid chromatography mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* 1997;25(3):275-80.
- [94] Mahajan MK, Evans CA. Dual negative precursor ion scan approach for rapid detection of glutathione conjugates using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2008;22(7):1032-40.
- [95] Kriemler P, Richter WJ. In situ methylation and/or FD-MS: a comparative study of their usefulness in the structure analysis of highly polar metabolites. In: Frigerio A, editor. *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine*. New York: Plenum Press; 1978.
- [96] Baker KM, Csetenyi J, Frigerio A, Morselli PL, Parravicini F, Pifferi G. 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxy-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide, a metabolite of carbamazepine isolated from human and rat urine. *J Med Chem.* 1973;16(6):703-5.
- [97] Morselli PL, Biandrate P, Frigerio A, Garattini S. Abstracts of the Sixth Annual Meeting of the European Society for Clinical Investigation, Scheveningen, The Netherlands, April 27–29, 1972. *Eur J Clin Invest.* 1972;2(4):297.
- [98] Csetenyi J, Baker KM, Frigerio A, Morselli PL. Iminostilbene—a metabolite of carbamazepine isolated from rat urine. *J Pharm Pharmacol.* 1973;25(4):340-1.
- [99] Lertratanangkoon K, Horning MG. Metabolism of Carbamazepine. *Drug Metab Dispos.* 1982;10(1):1-10.
- [100] Perucca E. Clinical consequences of microsomal enzyme induction by antiepileptic drugs. *Pharmacol Ther Dent.* 1978;2:285-314.
- [101] Eichelbaum M, Tomson T, Tybring G, Bertilsson L. Carbamazepine Metabolism in Man: Induction and Pharmacogenetic Aspects. *Clin Pharmacokinet.* 1985;10(1):80-90.
- [102] Knop A. Über die hydrographischen Beziehungen zwischen der Donau und der Aachquelle im badischen Oberlande. . Stuttgart: E Schwiezerbart; 1878.
- [103] Fenz R, Blaschke AP, Clara M, Kroiss H, Mascher D, Zessner M. Monitoring of carbamazepine concentrations in wastewater and groundwater to quantify sewer leakage. *Water Sci Technol.* 2005;52(5):205-13.
- [104] Wolf L, Eiswirth M, Hötzel H. Assessing sewer-groundwater interaction at the city scale based on individual sewer defects and marker species distributions. *Environ Geol.* 2006;49(6):849-57.



- 
- [105] Oppenheimer J, Eaton A, Badruzzaman M, Haghani AW, Jacangelo JG. Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions. *Water Res.* 2011;45(13):4019-27.
  - [106] Buerge IJ, Buser H-R, Kahle M, Müller MD, Poiger T. Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater. *Environ Sci Technol.* 2009;43(12):4381-5.
  - [107] Möller P, Paces T, Dulski P, Morteani G. Anthropogenic Gd in Surface Water, Drainage System, and the Water Supply of the City of Prague, Czech Republic. *Environ Sci Technol.* 2002;36(11):2387-94.
  - [108] Nozaki Y, Lerche D, Alibo DS, Tsutsumi M. Dissolved indium and rare earth elements in three Japanese rivers and Tokyo Bay: Evidence for anthropogenic Gd and In. *Geochim Cosmochim Acta.* 2000;64(23):3975-82.
  - [109] Ternes TA, Hirsch R. Occurrence and Behavior of X-ray Contrast Media in Sewage Facilities and the Aquatic Environment. *Environ Sci Technol.* 2000;34(13):2741-8.
  - [110] Kim SD, Cho J, Kim IS, Vanderford BJ, Snyder SA. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water Res.* 2007;41(5):1013-21.
  - [111] Knappe A, Sommer-von-Jarmersted C, Bau M, Dulski P. Gadolinium als Umwelttracer. *Umweltgeochemie in Wasser, Boden und Luft.* Berlin: Springer; 2000. p. 97-113.
  - [112] Nelson ED, Do H, Lewis RS, Carr SA. Diurnal Variability of Pharmaceutical, Personal Care Product, Estrogen and Alkylphenol Concentrations in Effluent from a Tertiary Wastewater Treatment Facility. *Environ Sci Technol.* 2011;45(4):1228-34.
  - [113] Neal C, Fox KK, Harrow M, Neal M. Boron in the major UK rivers entering the North Sea. *Sci Total Environ.* 1998;210-211(0):41-51.
  - [114] Zessner M, Voger B, Clara M, Kavka G, Kroiss H, editors. Monitoring of influences on groundwater caused by infiltration of treated waste water. *Proceedings of the 4th International Symposium on Wastewater Reclamation and Reuse; 2003, Nov. 12-14; Mexico City.*
  - [115] Dyer SD, Caprara RJ. A method for evaluating consumer product ingredient contributions to surface and drinking water: Boron as a test case. *Environ Toxicol Chem.* 1997;16(10):2070-81.
  - [116] Metzner G, Lind G, Nitschke L. Survey of boron levels in aquatic environments in Germany. *Tenside Surfact Det.* 1999;36.
  - [117] Neal C, Williams RJ, Bowes MJ, Harrass MC, Neal M, Rowland P, et al. Decreasing boron concentrations in UK rivers: Insights into reductions in detergent formulations since the 1990s and within-catchment storage issues. *Sci Total Environ.* 2010;408(6):1374-85.
  - [118] Jönsson H, Stenström TA, Svensson J, Sundin A. Source separated urine-nutrient and heavy metal content, water saving and faecal contamination. *Water Sci Technol* 1997. p. 145-52.
  - [119] Nödler K, Licha T, Fischer S, Wagner B, Sauter M. A case study on the correlation of micro-contaminants and potassium in the Leine River (Germany). *Appl Geochem.* 2011(0).
  - [120] Walling DE, Foster IDL. Variations in the natural chemical concentration of river water during flood flows, and the lag effect: Some further comments. *J Hydrol.* 1975;26(3-4):237-44.
  - [121] Sharpley AN, Smith SJ, Ahuja LR. Soluble potassium transport in agricultural runoff water. *Agr Water Manage.* 1988;15(1):37-46.
  - [122] Buerge IJ, Poiger T, Müller MD, Buser H-R. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environ Sci Technol.* 2003;37(4):691-700.
  - [123] Heberer T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J Hydrol.* 2002;266(3-4):175-89.
  - [124] Weyrauch P, Matzinger A, Pawlowsky-Reusing E, Plume S, von Seggern D, Heinzmann B, et al. Contribution of combined sewer overflows to trace contaminant loads in urban streams. *Water Res.* 2010;44(15):4451-62.
  - [125] Hillebrand O, Nödler K, Licha T, Sauter M, Geyer T. Caffeine as an indicator for the quantification of untreated wastewater in karst systems. *Water Res.* 2012;46(2).
  - [126] Carvalho JJ, Weller MG, Panne U, Schneider RJ. A highly sensitive caffeine immunoassay based on a monoclonal antibody. *Anal Bioanal Chem.* 2010;396(7):2617-28.
  - [127] Wiegel S, Aulinger A, Brockmeyer R, Harms H, Löffler J, Reincke H, et al. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere.* 2004;57(2):107-26.
  - [128] Liebig M, Moltmann JF, Knacker T. Evaluation of measured and predicted environmental concentrations of selected human pharmaceuticals and personal care products. *Environ Sci Pollut Res.* 2006;13(2):110-9.
  - [129] Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ Pollut.* 2009;157(2):561-8.
  - [130] Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett.* 2002;131(1-2):5-17.

- 
- [131] Sacher F, Lange FT, Brauch H-J, Blankenhorn I. Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *J Chromatogr A*. 2001;938(1-2):199-210.
- [132] Reddersen K, Heberer T. Multi-compound methods for the detection of pharmaceutical residues in various waters applying solid phase extraction (SPE) and gas chromatography with mass spectrometric (GC-MS) detection. *J Sep Sci*. 2003;26(15-16):1443-50.
- [133] Reddersen K. Das Verhalten von Arzneimittelnrückständen im Wasserkreislauf Berlins [Dissertation]. Technische Universität Berlin. 2004.
- [134] Loos R, Locoro G, Comero S, Contini S, Schwesig D, Werres F, et al. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res*. 2010;44(14):4115-26.
- [135] Stolker AM, Niesing W, Hogendoorn E, Versteegh JM, Fuchs R, Brinkman UT. Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. *Anal Bioanal Chem*. 2004;378(4):955-63.
- [136] Stackelberg PE, Gibs J, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, Lippincott RL. Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Sci Total Environ*. 2007;377(2-3):255-72.
- [137] Standley LJ, Rudel RA, Swartz CH, Attfield KR, Christian J, Erickson M, et al. Wastewater-contaminated groundwater as a source of endogenous hormones and pharmaceuticals to surface water ecosystems. *Environ Toxicol Chem*. 2008;27(12):2457-68.
- [138] Katz BG, Griffin DW, Davis JH. Groundwater quality impacts from the land application of treated municipal wastewater in a large karstic spring basin: Chemical and microbiological indicators. *Sci Total Environ*. 2009;407(8):2872-86.
- [139] Chávez A, Maya C, Gibson R, Jiménez B. The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environ Pollut*. 2011;159(5):1354-62.
- [140] Wasserversorgungskonzept für Berlin und für das von den BWB versorgte Umland (Entwicklung bis 2040), im Auftrag der Berliner Wasserbetriebe (BWB)2008.
- [141] Nationaler Gewässerbewirtschaftungsplan 2009: Österreichisches Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, [www.lebensministerium.at](http://www.lebensministerium.at).
- [142] Koch H, Kaltoven M, Grünewald U, Messner F, Karkuschke M, Zwirner O, et al. Scenarios of water resources management in the Lower Lusatian mining district, Germany. *Ecological Engineering*. 2005;24(1-2):49-57.
- [143] Schrum A. Wenn die Spree rückwärts fließt. *Die Zeit*. 25.10.1991.
- [144] Miehe U. Wirksamkeit technischer Barrieren zur Entfernung von anthropogenen Spurenstoffen - Kläranlagen und Raumfilter - [Dissertation]. Technische Universität Berlin. 2010.
- [145] Zühlke S. Verhalten von Phenazonderivaten, Carbamazepin und estrogenen Steroiden während verschiedener Verfahren der Wasseraufbereitung [Dissertation]. Technische Universität Berlin. 2004.
- [146] Adam M. Vorkommen und Bewertung von Pharmakarückständen im Berliner Gewässerkreislauf [Dissertation]. Technische Universität Berlin. 2010.
- [147] Verstraeten I, Heberer T, Scheytt T, Ray C, Melin G, Linsky R. Occurrence, Characteristics, Transport, and Fate of Pesticides, Pharmaceuticals, Industrial Products, and Personal Care Products at Riverbank Filtration Sites. In: Singh VP, editor. *Riverbank Filtration*: Springer Netherlands; 2003. p. 175-227.
- [148] Massmann G, Pekdeger A, Heberer T, Grützmaier G, Dünnebier U, Knappe A, et al. Drinking-Water Production in Urban Environments – Bank Filtration in Berlin. *Grundwasser*. 2007;12(3):232-45.
- [149] Eurostat: Kommunale Kläranlage mit zumindest sekundärer Behandlung Verfügbar unter: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>. Zuletzt abgerufen am 12.1.2012.
- [150] Rogers HR. Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. *Sci Total Environ*. 1996;185(1-3):3-26.
- [151] Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants -- I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of The Total Environment*. 1999;225(1-2):81-90.
- [152] Reemtsma T, Zywicki B, Stueber M, Klopfer A, Jekel M. Removal of Sulfur-Organic Polar Micropollutants in a Membrane Bioreactor Treating Industrial Wastewater. *Environ Sci Technol*. 2002;36(5):1102-6.
- [153] Cirja M, Ivashechkin P, Schäffer A, Corvini P. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2008;7(1):61-78.
- [154] Dal Pozzo A, Donzelli G, Rodriguez L, Tajana A. In vitro model for the evaluation of drug distribution and plasma protein-binding relationships. *Int J Pharm*. 1989;50(2):97-101.
- [155] Ternes TA, Herrmann N, Bonerz M, Knacker T, Siegrist H, Joss A. A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (Kd) for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Res*. 2004;38(19):4075-84.

- [156] Barron L, Tobin J, Paull B. Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Environ Mon.* 2008;10(3):353-61.
- [157] Nieto A, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in sewage sludge. *Environ Toxicol Chem.* 2010;29(7):1484-9.
- [158] Miao XS, Yang JJ, Metcalfe CD. Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant. *Environ Sci Technol.* 2005;39(19):7469-75.
- [159] Radjenović J, Jelić A, Petrović M, Barceló D. Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Anal Bioanal Chem.* 2009;393(6):1685-95.
- [160] Bendz D, Paxeus NA, Ginn TR, Loge FJ. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *J Hazard Mater.* 2005;122(3):195-204.
- [161] Paxeus N. Removal of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), gemfibrozil, carbamazepine, beta-blockers, trimethoprim and triclosan in conventional wastewater treatment plants in five EU countries and their discharge to the aquatic environment. *Water Sci Technol.* 2004;50(5):253-60.
- [162] Celiz MD, Perez S, Barcelo D, Aga DS. Trace Analysis of Polar Pharmaceuticals in Wastewater by LC-MS-MS: Comparison of Membrane Bioreactor and Activated Sludge Systems. *J Chromatogr Sci.* 2009;47(1):19-25.
- [163] Joss A, Keller E, Alder AC, Göbel A, McArdell CS, Ternes T, et al. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res.* 2005;39(14):3139-52.
- [164] Lacey C, Basha S, Morrissey A, Tobin J. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland. *Environ Monit Assess.* 2011:1-14.
- [165] Zühlke S, Dünnebier U, Heberer T. Determination of polar drug residues in sewage and surface water applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004;76(22):6548-54.
- [166] Vieno N, Tuhkanen T, Kronberg L. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Res.* 2007;41(5):1001-12.
- [167] Sui Q, Huang J, Deng S, Yu G, Fan Q. Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. *Water Res.* 2010;44(2):417-26.
- [168] Kosjek T, Andersen HR, Kompare B, Ledin A, Heath E. Fate of Carbamazepine during Water Treatment. *Environ Sci Technol.* 2009;43(16):6256-61.
- [169] Dsikowitzky L, Schwarzbauer J, Kronimus A, Littke R. The anthropogenic contribution to the organic load of the Lippe River (Germany). Part I: qualitative characterisation of low-molecular weight organic compounds. *Chemosphere.* 2004;57(10):1275-88.
- [170] Grohmann K, Gilbert E, Eberle SH. Identifizierung von Stickstoffverbindungen niedriger molarer Masse in Abläufen einer kommunalen Kläranlage mit biologischer Reinigungsstufe. *Acta hydrochim hydrobiol.* 1998;26(1):20-30.
- [171] Pena L, Gomez-Hens A, Pérez-Bendito D. Kinetic fluorimetric determination of carbamazepine in serum by the stopped-flow technique. *Fresenius J Anal Chem.* 1990;338(7):821-3.
- [172] Beyer K-H, Bredenstein O, Schenck G. Isolierung und Identifizierung eines Carbamazepin-Reaktionsproduktes. *Arzneim-Forsch.* 1971;21:1033.
- [173] Bendall M, Bremner J, Fay J. Acid-catalysed, thermal, and photochemical reactions of N-Nitroso-5H-dibenz[b,f]azepine. *Aust J Chem.* 1972;25(11):2451-65.
- [174] Hummel D, Löffler D, Fink G, Ternes TA. Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Environ Sci Technol.* 2006;40(23):7321-8.
- [175] Miao XS, Metcalfe CD. Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003;75(15):3731-8.
- [176] Kahle M, Buerge IJ, Müller MD, Poiger T. Hydrophilic anthropogenic markers for quantification of wastewater contamination in ground-and surface waters. *Environ Toxicol Chem.* 2009;28(12):2528-36.
- [177] Schütz H, Feldmann KF, Faigle JW, Kriemler H-P, Winkler T. The metabolism of <sup>14</sup>C-oxcarbazepine in man. *Xenobiotica.* 1986;16(8):769-78.
- [178] Zhao X, Metcalfe CD. Characterizing and Compensating for Matrix Effects Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Analysis of Neutral Pharmaceuticals in Municipal Wastewater. *Anal Chem.* 2008;80(6):2010-7.
- [179] Leclercq M, Mathieu O, Gomez E, Casellas C, Fenet H, Hillaire-Buys D. Presence and fate of carbamazepine, oxcarbazepine, and seven of their metabolites at wastewater treatment plants. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2009;56(3):408-15.
- [180] Langford K, Thomas KV. Input of selected human pharmaceutical metabolites into the Norwegian aquatic environment. *J Environ Mon.* 2011;13(2):416-21.
- [181] Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci Total Environ.* 1999;225(1-2):91-9.

- [182] Axelrod J, Inscoe JK, Tomkins GM. Enzymatic Synthesis of N-Glucosyluronic Acid Conjugates. *J Biol Chem.* 1958;232(2):835-42.
- [183] Ferrer I, Thurman EM. Identification of a New Antidepressant and its Glucuronide Metabolite in Water Samples Using Liquid Chromatography/Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2010;82(19):8161-8.
- [184] Gomes RL, Scrimshaw MD, Lester JN. Fate of Conjugated Natural and Synthetic Steroid Estrogens in Crude Sewage and Activated Sludge Batch Studies. *Environ Sci Technol.* 2009;43(10):3612-8.
- [185] Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in a Receiving River Water. *Environ Sci Technol.* 2000;34(24):5059-66.
- [186] Dray J, Dray F, Ullmann A, Tillier F. Hydrolysis of urinary steroid conjugates with escherichia-coli beta-glucuronidase. *Ann Inst Pasteur (Paris).* 1972;123(6):853-7.
- [187] Gagnon C, Lajeunesse A, Cejka P, Gagné F, Hausler R. Degradation of Selected Acidic and Neutral Pharmaceutical Products in a Primary-Treated Wastewater by Disinfection Processes. *Ozone: Science & Engineering.* 2008;30(5):387-92.
- [188] McDowell DC, Huber MM, Wagner M, von Gunten U, Ternes TA. Ozonation of Carbamazepine in Drinking Water: Identification and Kinetic Study of Major Oxidation Products. *Environ Sci Technol.* 2005;39(20):8014-22.
- [189] Ternes TA, Stüber J, Herrmann N, McDowell D, Ried A, Kampmann M, et al. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res.* 2003;37(8):1976-82.
- [190] Vieno NM, Härkki H, Tuhkanen T, Kronberg L. Occurrence of Pharmaceuticals in River Water and Their Elimination in a Pilot-Scale Drinking Water Treatment Plant. *Environ Sci Technol.* 2007;41(14):5077-84.
- [191] Yang X, Flowers RC, Weinberg HS, Singer PC. Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. *Water Res.* 2011;45(16):5218-28.
- [192] Snyder SA, Adham S, Redding AM, Cannon FS, DeCarolis J, Oppenheimer J, et al. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination.* 2007;202(1-3):156-81.
- [193] Doll TE, Frimmel FH. Removal of selected persistent organic pollutants by heterogeneous photocatalysis in water. *Catal Today.* 2005;101(3-4):195-202.
- [194] Gielen GJHP, Heuvel MRvd, Clinton PW, Greenfield LG. Factors impacting on pharmaceutical leaching following sewage application to land. *Chemosphere.* 2009;74(4):537-42.
- [195] Arye G, Dror I, Berkowitz B. Fate and transport of carbamazepine in soil aquifer treatment (SAT) infiltration basin soils. *Chemosphere.* 2011;82(2):244-52.
- [196] Löffler D, Römbke J, Meller M, Ternes TA. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environ Sci Technol.* 2005;39(14):5209-18.
- [197] Lam MW, Young CJ, Brain RA, Johnson DJ, Hanson MA, Wilson CJ, et al. Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environ Toxicol Chem.* 2004;23(6):1431-40.
- [198] Benotti MJ, Brownawell BJ. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environ Pollut.* 2009;157(3):994-1002.
- [199] Golan-Rozen N, Chefetz B, Ben-Ari J, Geva J, Hadar Y. Transformation of the Recalcitrant Pharmaceutical Compound Carbamazepine by *Pleurotus ostreatus*: Role of Cytochrome P450 Monooxygenase and Manganese Peroxidase. *Environ Sci Technol.* 2011;45(16):6800-5.
- [200] Kang SI, Kang SY, Hur HG. Identification of fungal metabolites of anticonvulsant drug carbamazepine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;79(4):663-9.
- [201] Marco-Urrea E, Pérez-Trujillo M, Vicent T, Caminal G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere.* 2009;74(6):765-72.
- [202] Rodríguez-Rodríguez CE, Marco-Urrea E, Caminal G. Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresour Technol.* 2009;101(7):2259-66.
- [203] Andreozzi R, Raffaele M, Nicklas P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere.* 2003;50(10):1319-30.
- [204] Matamoros V, Duhec A, Albaigés J, Bayona J. Photodegradation of Carbamazepine, Ibuprofen, Ketoprofen and 17-alpha-Ethinylestradiol in Fresh and Seawater. *Water, Air, Soil Pollut.* 2009;196(1):161-8.
- [205] Calisto V, Domingues MRM, Emy GL, Esteves VI. Direct photodegradation of carbamazepine followed by micellar electrokinetic chromatography and mass spectrometry. *Water Res.* 2011;45(3):1095-104.
- [206] Lam MW, Mabury SA. Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries.* 2005;67(2):177-88.

- 
- [207] Doll TE, Frimmel FH. Fate of pharmaceuticals--photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*. 2003;52(10):1757-69.
  - [208] Chiron S, Minero C, Vione D. Photodegradation Processes of the Antiepileptic Drug Carbamazepine, Relevant To Estuarine Waters. *Environ Sci Technol*. 2006;40(19):5977-83.
  - [209] Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S, Mottaleb MA, O'Donnell JG, Stahl LL, et al. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products in fish: Results of a national pilot study in the united states. *Environ Toxicol Chem*. 2009;28(12):2587-97.
  - [210] Kwon JW, Armbrust KL, Vidal-Dorsch D, Bay SM, Xia K. Determination of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, carbamazepine, diazepam, simvastatin, and oxybenzone in fish livers. *J AOAC Int*. 2009;92(1):359-70.
  - [211] Zhou SN, Oakes KD, Servos MR, Pawliszyn J. Application of Solid-Phase Microextraction for In Vivo Laboratory and Field Sampling of Pharmaceuticals in Fish. *Environ Sci Technol*. 2008;42(16):6073-9.
  - [212] Exportorientierte Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Wasserver- und -entsorgung; Teil II: Abwasserbehandlung und Wasserwiederverwendung, Band 1: Anforderungen an die Abwassertechnik in anderen Ländern Cornel P, editor: Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft und Umwelttechnik; 2004.
  - [213] Avnimelech Y. Irrigation with sewage effluents: the Israeli experience. *Environ Sci Technol*. 1993;27(7):1278-81.
  - [214] Ternes TA, Bonerz M, Herrmann N, Teiser B, Andersen HR. Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere*. 2007;66(5):894-904.
  - [215] Winker M, Clemens J, Reich M, Gulyas H, Otterpohl R. Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *Sci Total Environ*. 2010;408(8):1902-8.
  - [216] Shenker M, Harush D, Ben-Ari J, Chefetz B. Uptake of carbamazepine by cucumber plants - A case study related to irrigation with reclaimed wastewater. *Chemosphere*. 2011;82(6):905-10.
  - [217] Eurostat: Landwirtschaftliche Verwertung von Klärschlamm aus öffentlicher Abwasserbehandlung. Verfügbar unter: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu>. Zuletzt abgerufen am 13.1.2012.
  - [218] Umweltbundesamt. Bewertung der Anwesenheit teil- oder nicht bewertbarer Stoffe im Trinkwasser. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz. 2003;46:249-51.
  - [219] Dieter HH, Götz K, Kümmerer K, Rechenberg B, Keil F. Handlungsmöglichkeiten zur Minderung des Eintrags von Humanarzneimitteln und ihren Rückständen in das Roh- und Trinkwasser Umweltbundesamt, Institut für sozialökologische Forschung 2010 Contract No.: 4.1.11.
  - [220] Dieter HH. Podiumsdiskussion anlässlich des Symposiums "20 Years of Research in the Field of Endocrine Disruptors & Pharmaceutical Compounds", Berlin, 10.02.2010
  - [221] Gros M, Petrovic M, Barceló D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*. 2006;70(4):678-90.
  - [222] Lacey C, McMahon G, Bones J, Barron L, Morrissey A, Tobin JM. An LC-MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta*. 2008;75(4):1089-97.
  - [223] Rütters H, Möhring T, Rullkötter J, Griep-Raming J, Metzger JO. The persistent memory effect of triethylamine in the analysis of phospholipids by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2000;14(2):122-3.
  - [224] Dijkman E, Mooibroek D, Hoogerbrugge R, Hogendoorn E, Sancho J-V, Pozo O, et al. Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 2001;926(1):113-25.
  - [225] Choi BK, Hercules DM, Gusev AI. LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius J Anal Chem*. 2001;369(3):370-7.
  - [226] Pascoe R, Foley JP, Gusev AI. Reduction in Matrix-Related Signal Suppression Effects in Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using On-Line Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal Chem*. 2001;73(24):6014-23.
  - [227] Hernandez MD, Petrovic M, Fernández-Alba AR, Barceló D. Analysis by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for [beta]-blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples. *J Chromatogr A*. 2004;1046(1-2):133-40.
  - [228] Gomez MJ, Petrovic M, Fernandez-Alba AR, Barcelo D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromatogr A*. 2006;1114(2):224-33.
  - [229] Benijts T, Dams R, Lambert W, De Leenheer A. Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals. *J Chromatogr A*. 2004;1029(1-2):153-9.
  - [230] Van De Steene JC, Mortier KA, Lambert WE. Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *J Chromatogr A*. 2006;1123(1):71-81.

- [231] Vanderford BJ, Pearson RA, Rexing DJ, Snyder SA. Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in Water Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2003;75(22):6265-74.
- [232] Zuehlke S, Duennbier U, Heberer T. Determination of polar drug residues in sewage and surface water applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004;76(22):6548-54.
- [233] Liang HR, Foltz RL, Meng M, Bennett P. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17(24):2815-21.
- [234] van Hout MWJ, Niederländer HAG, de Zeeuw RA, de Jong GJ. Ion suppression in the determination of clenbuterol in urine by solid-phase extraction atmospheric pressure chemical ionisation ion-trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17(3):245-50.
- [235] Arrhenius S. *Immunochemie.* Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft; 1907.
- [236] Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *J Clin Invest.* 1960;39(7):1157-75.
- [237] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971;8(9):871-4.
- [238] Van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 1971;15(3):232-6.
- [239] Krämer P, Martens D, Forster S, Ipolyi I, Brunori C, Morabito R. How can immunochemical methods contribute to the implementation of the Water Framework Directive? *Anal Bioanal Chem.* 2007;387(4):1435-48.
- [240] Hock B, Dankwardt A, Kramer K, Marx A. Immunochemical techniques: Antibody production for pesticide analysis. A review. *Anal Chim Acta.* 1995;311(3):393-405.
- [241] Raman Suri C, Boro R, Nangia Y, Gandhi S, Sharma P, Wangoo N, et al. Immunoanalytical techniques for analyzing pesticides in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2009;28(1):29-39.
- [242] Marquette CA, Blum LcJ. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens Bioelectron.* 2006;21(8):1424-33.
- [243] Wild D. *The Immunoassay Handbook.* 2nd ed. London: Nature Publishing Group; 2001.
- [244] Salvador JP, Adrian J, Galve R, Pinacho DG, Kreuzer M, Sánchez-Baeza F, et al. Application of bioassays/biosensors for the analysis of pharmaceuticals in environmental samples. In: Petrovic M, Barceló D, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry 50.* Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 279-334.
- [245] Estévez MC, Font H, Nickkova M, Salvador JP, Varela B, Sánchez-Baeza F, et al. Immunochemical Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products as Emerging Pollutants. *The Handbook of Environmental Chemistry: Springer Berlin / Heidelberg;* 2005. p. 193-206.
- [246] Adrian J, Fernández F, Muriano A, Obregón R, Ramón J, Tort N, et al. Immunochemical Analytical Methods for Monitoring the Aquatic Environment. *Analytical Measurements in Aquatic Environments: CRC Press;* 2009. p. 139-87.
- [247] Winklmair M, Weller MG, Mangler J, Schlosshauer B, Niessner R. Development of a highly sensitive enzyme-immunoassay for the determination of triazine herbicides. *Fresenius J Anal Chem.* 1997;358(5):614-22.
- [248] Deng AP, Himmelsbach M, Zhu QZ, Frey S, Sengl M, Buchberger W, et al. Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS. *Environ Sci Technol.* 2003;37(15):3422-9.
- [249] Knopp D, Deng A, Letzel M, Taggart M, Himmelsbach M, Zhu Q-Z, et al. Immunological Determination of the Pharmaceutical Diclofenac in Environmental and Biological Samples. *Rational Environmental Management of Agrochemicals: American Chemical Society;* 2007. p. 203-26.
- [250] Farré M, Kuster M, Brix R, Rubio F, Alda M-JLd, Barceló D. Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *J Chromatogr A.* 2007;1160(1-2):166-75.
- [251] Schneider C, Schöler HF, Schneider RJ. Direct sub-ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Chim Acta.* 2005;551(1-2):92-7.
- [252] Hintemann T, Schneider C, Schöler HF, Schneider RJ. Field study using two immunoassays for the determination of estradiol and ethinylestradiol in the aquatic environment. *Water Res.* 2006;40(12):2287-94.
- [253] Watanabe E, Kanzaki Y, Tokumoto H, Hoshino R, Kubo H, Nakazawa H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Polyclonal Antibody for the Detection of the Insecticide Fenitrothion. Evaluation of Antiserum and Application to the Analysis of Water Samples. *J Agric Food Chem.* 2001;50(1):53-8.
- [254] Huo S-M, Yang H, Deng A-P. Development and validation of a highly sensitive ELISA for the determination of pharmaceutical indomethacin in water samples. *Talanta.* 2007;73(2):380-6.

- 
- [255] Pu C, Wu Y-F, Yang H, Deng A-P. Trace analysis of contraceptive drug levonorgestrel in wastewater samples by a newly developed indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) coupled with solid phase extraction. *Anal Chim Acta*. 2008;628(1):73-9.
  - [256] Dolliver H, Kumar K, Gupta S, Singh A. Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Analysis for Determination of Monensin in Environmental Samples. *J Environ Qual*. 2008;37(3):1220-6.
  - [257] Liu W, Zhao C, Zhang Y, Lu S, Liu J, Xi R. Preparation of Polyclonal Antibodies to a Derivative of 1-Aminohydantoin (AHD) and Development of an Indirect Competitive ELISA for the Detection of Nitrofurantoin Residue in Water. *J Agric Food Chem*. 2007;55(17):6829-34.
  - [258] Himmelsbach M, Buchberger W. Residue Analysis of Oxytetracycline in Water and Sediment Samples by High-Performance Liquid Chromatography and Immunochemical Techniques. *Microchimica Acta*. 2005;151(1):67-72.
  - [259] Shelver WL, Shappell NW, Franek M, Rubio FR. ELISA for Sulfonamides and Its Application for Screening in Water Contamination. *J Agric Food Chem*. 2008;56(15):6609-15.
  - [260] Kumar K, Thompson A, Singh AK, Chander Y, Gupta SC. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Ultratrace Determination of Antibiotics in Aqueous Samples. *J Environ Qual*. 2004;33(1):250-6.
  - [261] Rowell V. Nunc Guide to Solid Phase Immunoassays. Roskilde, Dänemark: Nunc A/S; 2001 Verfügbar unter: <http://www.nuncbrand.com/files/fr-604.pdf>. Zuletzt abgerufen am 27.01.2012.
  - [262] Hosoda H, Takasaki W, Tsukamoto R, Nambara T. Sensitivity of steroid enzyme immunoassays. Comparison of four label enzymes in an assay system using a monoclonal anti-steroid antibody. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1989;37(7):1834-7.
  - [263] Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKenzie IGM, Raab GM, et al. Guidelines for Immunoassay Data-Processing. *Clin Chem*. 1985;31(8):1264-71.
  - [264] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 1996 Verfügbar unter: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf). Zuletzt abgerufen am 27.01.2012.
  - [265] Brady JF. Mathematical aspects of immunoassays. In: Emon JMV, editor. *Immunoassay and other bioanalytical techniques*: CRC Press; 2006. p. 249-63.
  - [266] Hayashi Y, Matsuda R, Maitani T, Imai K, Nishimura W, Ito K, et al. Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA. *Anal Chem*. 2004;76(5):1295-301.
  - [267] Ekins R. The "Precision Profile": Its Use in RIA Assessment and Design. *The Ligand Quarterly*. 1981;4(2):33-44.
  - [268] Pratt JJ, Woldring MG, Boonman R, Kittikool J. Specificity of immunoassays. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 1979;4(3):159-70.
  - [269] Abraham GE. Solid-Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17beta. *J Clin Endocrinol Metab*. 1969;29(6):866-70.
  - [270] Weller MG, Zeck A, Eikenberg A, Nagata S, Ueno Y, Niessner R. Development of a Direct Competitive Microcystin Immunoassay of Broad Specificity. *Anal Sci*. 2001;17(12):1445-8.
  - [271] Weller MG. Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden. [Dissertation]. Technische Universität München. 1992.
  - [272] Vining R, Compton P, McGinley R. Steroid radioimmunoassay - effect of shortened incubation time on specificity. *Clin Chem*. 1981;27(6):910-3.
  - [273] Graves S, Sharma K, Chandler A. Methods for eliminating interferences in digoxin immunoassays caused by digoxin-like factors. *Clin Chem*. 1986;32(8):1506-9.
  - [274] Scherrmann JM, Sandouk P, Guedeney X. Endogenous digitalis-like immunoreactive substances in cord serum characterized by anti-digoxin and anti-digoxin antibodies. Effect of modulated incubation conditions. *Clin Biochem*. 1986;19(4):201-4.
  - [275] Yannakou L, Diamandis EP, Souvatzoglou A. Effect of incubation time and temperature on the interference of digoxin-like immunoreactive substances in digoxin immunoassays. *Ther Drug Monit*. 1987;9(4):461-3.
  - [276] Johnstone RW, Andrew SM, Hogarth MP, Pietersz GA, McKenzie IFC. The effect of temperature on the binding kinetics and equilibrium constants of monoclonal antibodies to cell surface antigens. *Mol Immunol*. 1990;27(4):327-33.
  - [277] Findlay JWA, Dillard RF. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS J*. 2007;9(2):E260-E7.
  - [278] Miller JJ, Valdes R, Jr. Methods for calculating crossreactivity in immunoassays. *J Clin Immunoassay*. 1992;15(2):97-107.
  - [279] Nödler K, Licha T, Bester K, Sauter M. Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples. *J Chromatogr A*. 2010;1217(42):6511-21.

- [280] Bahlmann A, Weller MG, Panne U, Schneider RJ. Monitoring carbamazepine in surface and wastewaters by an immunoassay based on a monoclonal antibody. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395(6):1809-20.
- [281] Schonbaum GR, Lo S. Interaction of Peroxidases with Aromatic Peracids and Alkyl Peroxides. *J Biol Chem.* 1972;247(10):3353-60.
- [282] Dunford HB, Stillman JS. On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coord Chem Rev.* 1976;19(3):187-251.
- [283] Veitch NC, Smith AT. Horseradish peroxidase. *Advances in Inorganic Chemistry: Academic Press;* 2000. p. 107-62.
- [284] Frey A, Meckelein B, Externest D, Schmidt MA. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods.* 2000;233(1-2):47-56.
- [285] Bahlmann A, Falkenhagen J, Weller MG, Panne U, Schneider RJ. Cetirizine as pH-dependent cross-reactant in a carbamazepine-specific immunoassay. *Analyst.* 2011;136(7):1357-64.
- [286] 2002/657/EG - Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen, Aktenzeichen K(2002) 3044. *Amtsblatt der Europäischen Union L 221 (17.8.2002).* S. 8–36
- [287] Vanderford B, Mawhinney D, Trenholm R, Zeigler-Holady J, Snyder S. Assessment of sample preservation techniques for pharmaceuticals, personal care products, and steroids in surface and drinking water. *Anal Bioanal Chem.* 2011;399(6):2227-34.
- [288] Yu Z, Peldszus S, Huck PM. Optimizing gas chromatographic-mass spectrometric analysis of selected pharmaceuticals and endocrine-disrupting substances in water using factorial experimental design. *J Chromatogr A.* 2007;1148(1):65-77.
- [289] Welinder KG. Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase. *Eur J Biochem.* 1979;96(3):483-502.
- [290] Shannon LM, Kay E, Lew JY. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. *J Biol Chem.* 1966;241(9):2166-72.
- [291] Welinder KG. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). *FEBS Lett.* 1976;72(1):19-23.
- [292] Wuhrer M, Koeleman CAM, Hokke CH, Deelder AM. Protein Glycosylation Analyzed by Normal-Phase Nano-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Glycopeptides. *Anal Chem.* 2005;77(3):886-94.
- [293] Maehly AC. Plant peroxidase. *Methods Enzymol.* 1955;2:801-13.
- [294] Paul KG, Stigbrand T. Four Isoperoxidases from Horse Radish Root. *Acta Chem Scand.* 1970;24:3607-17.
- [295] Yi X, Batrakova E, Banks WA, Vinogradov S, Kabanov AV. Protein Conjugation with Amphiphilic Block Copolymers for Enhanced Cellular Delivery. *Bioconj Chem.* 2008;19(5):1071-7.
- [296] Guo S, Cao R, Lu A, Zhou Q, Lu T, Ding X, et al. One of the possible mechanisms for the inhibition effect of Tb(III) on peroxidase activity in horseradish (*A Armoracia rusticana*) treated with Tb(III). *J Biol Inorg Chem.* 2008;13(4):587-97.
- [297] Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-Labeled Antibody - New Method of Conjugation. *J Histochem Cytochem.* 1974;22(12):1084-91.
- [298] Carvalho JJ. Immunochemical and Chromatographic Methods for Two Anthropogenic Markers of Contamination in Surface Waters: Caffeine and Coprostanol [Dissertation]. Humboldt-Universität zu Berlin. 2011.
- [299] Kull S. Entwicklung eines Immunoassays für das Mykotoxin Ochratoxin A [Diplomarbeit]. Humboldt-Universität zu Berlin. 2006.
- [300] Esser P. Technical Bulletin 06a: Principles in Adsorption to Polystyrene. Roskilde, Dänemark: Nunc A/S; 2010 Verfügbar unter: <http://www.nuncbrand.com/us/frame.aspx?ID=579>. Zuletzt abgerufen am 27.01.2012.
- [301] Jackson TM, Ekins RP. Theoretical Limitations on Immunoassay Sensitivity - Current Practice and Potential Advantages of Fluorescent Eu-3+ Chelates as Nonradioisotopic Tracers. *J Immunol Methods.* 1986;87(1):13-20.
- [302] Sauer MJ, Foulkes JA, O'Neill PM. A comparison of alkaline phosphatase,  $\beta$ -galactosidase, penicillinase and peroxidase used as labels for progesterone determination in milk by heterologous microtitre plate enzymeimmunoassay. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1989;33(3):423-31.
- [303] Niechcynski M. Aufbau und Optimierung eines Immunoassays zur Bestimmung von Koffein in Oberflächengewässern [Diplomarbeit]. Technische Fachhochschule Berlin. 2007.
- [304] Pratt JJ, Woldring MG. Radioimmunoassay specificity and the "first-come, first-served effect". *Clin Chim Acta.* 1976;68(1):87-90.
- [305] Pannenbecker K. Anwendung und Validierung eines Carbamazepin-ELISA für Probenmatrices im Wasserkreislauf Berlins [Diplomarbeit]. Technische Universität Berlin. 2010.



- 
- [306] Calisto V, Bahlmann A, Schneider RJ, Esteves VI. Application of an ELISA to the quantification of carbamazepine in ground, surface and wastewaters and validation with LC-MS/MS. *Chemosphere*. 2011;84:1708-15.
  - [307] Weller MG. Chemische und physikalische Einflüsse auf die Triazin-Bestimmung im Wasser mittels Enzymimmunoassay [Diplomarbeit]. Technische Universität München. 1989.
  - [308] Estevez MC, Galve R, Sanchez-Baeza F, Marco MP. Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of the Highly Polar Short-Chain Sulfophenyl Carboxylates. *Anal Chem*. 2005;77(16):5283-93.
  - [309] Kolosova AY, Shim WB, Yang ZY, Eremin SA, Chung DH. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B-1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Anal Bioanal Chem*. 2006;384(1):286-94.
  - [310] Schneider C, Schöler HF, Schneider RJ. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for ethynylestradiol using a long-chain biotinylated EE2 derivative. *Steroids*. 2004;69(4):245-53.
  - [311] Parant F, Moulisma M, Gagnieu MC, Lardet G. Hydroxyzine and metabolites as a source of interference in carbamazepine particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay (PETINIA). *Ther Drug Monit*. 2005;27(4):457-62.
  - [312] Parant F, Bossu H, Gagnieu MC, Lardet G, Moulisma M. Cross-reactivity assessment of carbamazepine-10,11-epoxide, oxcarbazepine, and 10-hydroxy-carbazepine in two automated carbamazepine immunoassays: PETINIA and EMIT 2000. *Ther Drug Monit*. 2003;25(1):41-5.
  - [313] Pagliara A, Testa B, Carrupt PA, Jolliet P, Morin C, Morin D, et al. Molecular properties and pharmacokinetic behavior of cetirizine, a zwitterionic H-1-receptor antagonist. *J Med Chem*. 1998;41(6):853-63.
  - [314] Newton DW, Murray WJ, Lovell MW. pKa determination of benzhydrylpiperazine antihistamines in aqueous and aqueous methanol solutions. *J Pharm Sci*. 1982;71(12):1363-6.
  - [315] Cantu MD, Hillebrand S, Carrilho E. Determination of the dissociation constants (pKa) of secondary and tertiary amines in organic media by capillary electrophoresis and their role in the electrophoretic mobility order inversion. *J Chromatogr A*. 2005;1068(1):99-105.
  - [316] Wiczling P, Waszczuk-Jankowska M, Markuszewski MJ, Kaliszan R. The application of gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography to the pKa and log[thin space]kw determination of polyprotic analytes. *J Chromatogr A*. 2008;1214(1-2):109-14.
  - [317] Buckenmaier SMC, McCalley DV, Euerby MR. Determination of pKa values of organic bases in aqueous acetonitrile solutions using capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*. 2003;1004(1-2):71-9.
  - [318] Embil K, Torosian G. Solubility and ionization characteristics of doxepin and desmethyldoxepin. *J Pharm Sci*. 1982;71(2):191-3.
  - [319] Szabados-Nacsá Á, Sipos P, Martinek T, Mándity I, Blazsó G, Balogh Á, et al. Physico-chemical characterization and in vitro/in vivo evaluation of loratadine:dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. *J Pharm Biomed Anal*. 55(2):294-300.
  - [320] Hall NF. The Strength of Organic Bases in Glacial Acetic Acid Solution. *J Am Chem Soc*. 1930;52(12):5115-28.
  - [321] Huh Y, Lee J-G, McPhail DC, Kim K. Measurement of pH at elevated temperatures using the optical indicator acridine. *J Solution Chem*. 1993;22(7):651-61.
  - [322] SciFinder. Verfügbar unter: <https://scifinder.cas.org>. Zuletzt abgerufen am 13.1.2012.
  - [323] Jones OAH, Voulvoulis N, Lester JN. Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Res*. 2002;36(20):5013-22.
  - [324] Oppel J, Broll G, Löffler D, Meller M, Römbke J, Ternes T. Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Sci Total Environ*. 2004;328(1-3):265-73.
  - [325] Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software. Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada; Verfügbar unter: [www.acdlabs.com/physchem/](http://www.acdlabs.com/physchem/). Zuletzt abgerufen am 27.01.2012.
  - [326] Meloun M, Bordovská S. Benchmarking and validating algorithms that estimate pKa values of drugs based on their molecular structures. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389(4):1267-81.
  - [327] Hu XR, Gu JM, Lu GL. Crystal structure of 1-[(4-chloro-phenyl)-phenyl-methyl]piperazine, C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>. *Z Kristallogr-New Cryst Struct*. 2003;218(4):497-8.
  - [328] Hougardy S, Rocca N, Thimm M. COSMOS - Comparing Small Molecules For Similarity. 2004 Verfügbar unter: <http://cosmos.informatik.hu-berlin.de>. Zuletzt abgerufen am 20.10.2010.
  - [329] Reboul JP, Cristau B, Soyfer JC, Estienne J. Structure de la 5H-dibenzo[b,f]azepine (iminostilbene), support tricyclique d'analogues structuraux des antidépresseurs imipraminiques. *Acta Crystallogr B*. 1980;36(11):2683-8.
  - [330] Jasinski JP, Pek AE, Siddaraju B, Yathirajan HS, Narayana B. Opipramol dipicrate. *Acta Crystallogr E*. 2010;66(8):o1979-80.
  - [331] Bandoli G, Nicolini M, Ongaro A, Volpe G, Rubello A. X-ray crystallographic characterization of 10,11-dihydro-5H-dibenzo[b, f]azepine-5-carboxamide. *J Chem Crystallogr*. 1992;22(2):177-83.

- [332] Harrison WTA, Yathirajan HS, Anilkumar HG. An orthorhombic polymorph of 10,11-dihydrocarbamazepine. *Acta Crystallogr C*. 2006;62(5):o240-o2.
- [333] Lisgarten JN, Palmer RA, Saldanha JW. The structure of 10,11-dihydro-10-hydroxy-5H-dibenz[b,f]azepine-5-carboxamide, an anticonvulsant drug molecule. *Acta Crystallogr C*. 1989;45(4):656-8.
- [334] Hempel A, Camerman N, Camerman A, Mastropaolo D. Oxcarbazepine: structure and anticonvulsant activity. *Acta Crystallogr E*. 2005;61(5):o1313-o5.
- [335] Bindya S, Wong W-T, Ashok MA, Yathirajan HS, Rathore RS. Amitriptylinium picrate: conformational disorder. *Acta Crystallogr C*. 2007;63(9):o546-o8.
- [336] Bhatt PM, Desiraju GR. Form I of desloratadine, a tricyclic antihistamine. *Acta Crystallogr C*. 2006;62(6):o362-o3.
- [337] Post ML, Kennard O, Horn AS. The tricyclic antidepressants: imipramine hydrochloride. The crystal and molecular structure of 5-(3-dimethylaminopropyl)-10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepine hydrochloride. *Acta Crystallogr B*. 1975;31(4):1008-13.
- [338] Glaser R, Maartmann-Moe K. X-Ray crystallography studies and CP-MAS <sup>13</sup>C NMR spectroscopy on the solid-state stereochemistry of diphenhydramine hydrochloride, an antihistaminic drug. *J Chem Soc Perk T 2*. 1990(7):1205-10.
- [339] DeLacy TP, Kennard CHL. Insecticides. Part II. Crystal structures of 1,1-bis-(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane (p,p[prime or minute]-DDT) and 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane (o,p[prime or minute]-DDT). *J Chem Soc Perk T 2*. 1972(14):2148-53.
- [340] Jasinski JP, Butcher RJ, Siddegowda MS, Yathirajan HS, Ramesha AR. Levocetirizinium dipicrate. *Acta Crystallographica Section E*. 66(12):o3167.
- [341] Goeta AE, Punte G, Rivero BE. Refinement of the molecular structure of benzhydramine hydrochloride. *Acta Crystallogr C*. 1993;49(11):1996-8.
- [342] Marubayashi N, Fujii I, Hirayama N. Crystal Structure of 1-{2-[(p-Chloro- $\alpha$ -phenylbenzyl)oxy]ethyl}piperidine Fendizoate (Cloperastine Fendizoate). *Anal Sci*. 1999;15(8):813-4.
- [343] Rodriguez MA, Bunge SD. Diphenylamine. *Acta Crystallogr E*. 2003;59(8):o1123-o5.
- [344] Klebe G. The use of crystal data together with other experimental and computational results to discuss structure-reactivity and activity relationships. *Struct Chem*. 1990;1(6):597-616.
- [345] Landsteiner K, van der Scheer J. Serological Differentiation of Steric Isomers. *J Exp Med*. 1928;48(3):315-20.
- [346] Kern D, Lorenz W. Rückstände ausgewählter Humanarzneimittel in Oberflächenwasserkörpern im Einzugsgebiet Halle (Saale). *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*. 2008;20(2):97-101.
- [347] Bisceglia KJ, Yu JT, Coelhan M, Bouwer EJ, Roberts AL. Trace determination of pharmaceuticals and other wastewater-derived micropollutants by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010;1217(4):558-64.
- [348] Batt AL, Kostich MS, Lazorchak JM. Analysis of Ecologically Relevant Pharmaceuticals in Wastewater and Surface Water Using Selective Solid-Phase Extraction and UPLC-MS/MS. *Anal Chem*. 2008;80(13):5021-30.
- [349] Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res*. 2008;42(13):3498-518.
- [350] Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res*. 2009;43(2):363-80.
- [351] Lajeunesse A, Gagnon C, Sauve S. Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2008;80(14):5325-33.
- [352] Nakada N, Komori K, Suzuki Y, Konishi C, Houwa I, Tanaka H. Occurrence of 70 pharmaceutical and personal care products in Tone River basin in Japan. *Water Sci Technol*. 2007;56(12):133-40.
- [353] Unceta N, Sampedro MC, Bakar NKA, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Barrio RJ. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010;1217(20):3392-9.
- [354] Togola A, Budzinski H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J Chromatogr A*. 2008;1177(1):150-8.
- [355] Kosonen J, Kronberg L. The occurrence of antihistamines in sewage waters and in recipient rivers. *Environ Sci Pollut Res*. 2009;16(5):555-64.
- [356] Reid MJ, Langford KH, Mørland J, Thomas KV. Quantitative assessment of time dependent drug-use trends by the analysis of drugs and related metabolites in raw sewage. *Drug Alcohol Depend*. 2011;119(3):179-86.

- [357] Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F. Fast liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *J Chromatogr A*. 2010;1217(25):4212-22.
- [358] Wennmalm Å, Gunnarsson B. Pharmaceutical management through environmental product labeling in Sweden. *Environ Int*. 2009;35(5):775-7.
- [359] Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DGJ. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem*. 2009;28(12):2522-7.
- [360] Stackelberg PE, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, Henderson AK, Reissman DB. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Sci Total Environ*. 2004;329(1-3):99-113.
- [361] Ferrer I, Heine CE, Thurman EM. Combination of LC/TOF-MS and LC/Ion Trap MS/MS for the Identification of Diphenhydramine in Sediment Samples. *Anal Chem*. 2004;76(5):1437-44.
- [362] Hai FI, Tadkaew N, McDonald JA, Khan SJ, Nghiem LD. Is halogen content the most important factor in the removal of halogenated trace organics by MBR treatment? *Bioresour Technol*. 2011;102(10):6299-303.
- [363] Rudorfer MV, Potter WZ. Metabolism of Tricyclic Antidepressants. *Cell Mol Neurobiol*. 1999;19(3):373-409.
- [364] Davies C. Assay Concepts. In: Wild D, editor. *The Immunoassay Handbook*. 2nd ed. London: Nature Publishing Group; 2001. p. 78-110.
- [365] Schneider RJ, Weil L, Niessner R. Identification of two triazine herbicides in top soil layers using immunoassays of different selectivity. *Fresenius J Anal Chem*. 1992;343(1):145-6.
- [366] Kreuzinger N. Review on the assessment of the removal efficiency of wastewater treatment plants for selected xenobiotics. In: Hlavinek P, Bonacci O, Marsalek J, Mahrikova I, editors. *Dangerous Pollutants (Xenobiotics) in Urban Water Cycle (NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security)*. Netherlands: Springer; 2008. p. 227-44.
- [367] Capotorti G, Digianvincenzo P, Cesti P, Bernardi A, Guglielmetti G. Pyrene and benzo(a)pyrene Metabolism by an *Aspergillus Terreus* Strain Isolated from a Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Polluted Soil. *Biodegradation*. 2004;15(2):79-85.
- [368] Abwasserbeseitigungsplan, Regenwasserableitung. Senatsverwaltung für Stadtentwicklung, Umweltschutz und Technologie; 1999 Verfügbar unter: <http://www.berlin.de/sen/umwelt/wasser/regenwasser/>. Zuletzt abgerufen am 2.9.2011.
- [369] Al-Rifai JH, Gabelish CL, Schäfer AI. Occurrence of pharmaceutically active and non-steroidal estrogenic compounds in three different wastewater recycling schemes in Australia. *Chemosphere*. 2007;69(5):803-15.
- [370] Loos R, Gawlik B, Locorco G, Rimavicitte E, Contini S, Bidoglio G. EU wide monitoring survey of polar persistent pollutants in European river waters. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2008.
- [371] Lin WC, Chen HC, Ding WH. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005;1065(2):279-85.
- [372] Zhou X, Dai C, Zhang Y, Surampalli R, Zhang T. A preliminary study on the occurrence and behavior of carbamazepine (CBZ) in aquatic environment of Yangtze River Delta, China. *Environ Monit Assess*. 2011;173(1):45-53.
- [373] Yu Y, Huang Q, Wang Z, Zhang K, Tang C, Cui J, et al. Occurrence and behavior of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in wastewater and the recipient river water of the Pearl River Delta, South China. *J Environ Mon*. 2011;13(4):871-8.
- [374] Sponberg AL, Witter JD, Acuña J, Vargas J, Murillo M, Umaña G, et al. Reconnaissance of selected PPCP compounds in Costa Rican surface waters. *Water Res*. 2011;45(20):6709-17.
- [375] Bernhard M, Müller J, Knepper TP. Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Res*. 2006;40(18):3419-28.
- [376] Reinstorf F, Strauch G, Schirmer K, Gläser HR, Möder M, Wennrich R, et al. Mass fluxes and spatial trends of xenobiotics in the waters of the city of Halle, Germany. *Environ Pollut*. 2008;152(2):452-60.
- [377] Möhle E, Horvath, S., Merz, W., Metzger, J.W., 1999. Bestimmung von schwer abbaubaren organischen Verbindungen im Abwasser - Identifizierung von Arzneimittlrückständen. *Vom Wasser*. 1999;92:207-23.
- [378] Ternes T, Janex-Habibi ML, Knacker T, Kreuzinger N, Siegrist H. Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable Water Reuse (EU project). 2004 Verfügbar unter: <http://poseidon.bafg.de>. Zuletzt abgerufen am 21.3.2012.
- [379] Massmann G, Sultenfuss J, Dunnbier U, Knappe A, Taute T, Pekdeger A. Investigation of groundwater a residence times during bank filtration in Berlin: multi-tracer approach. *Hydrol Process*. 2008;22(6):788-801.

- 
- [380] Letzel M, Weiss K, Schüssler W, Sengl M. Occurrence and fate of the human pharmaceutical metabolite ritalinic acid in the aquatic system. *Chemosphere*. 2010;81(11):1416-22.
- [381] Wick A, Fink G, Joss A, Siegrist H, Ternes TA. Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Res*. 2009;43(4):1060-74.
- [382] Bataineh M, Nolte J, Kuhlmann B, Zullei-Seibert N, Borges M, Grote M. Degradation Behavior of Selected Pharmaceuticals and Their Main Metabolites in Model Systems for Slow Sand Filtration. *Curr Pharm Anal*. 2006;2(3):313-22.
- [383] Musolff A, Leshik S, Schafmeister M-T, Reinstorf F, Strauch G, Krieg R, et al. Evaluation of xenobiotic impact on urban receiving waters by means of statistical methods. *Water Sci Technol*. 2010;62(3):684-92.
- [384] Scheurer M, Storck FR, Graf C, Brauch H-J, Ruck W, Lev O, et al. Correlation of six anthropogenic markers in wastewater, surface water, bank filtrate, and soil aquifer treatment. *J Environ Mon*. 2011;13(4):966-73.
- [385] Reemtsma T, Weiss S, Mueller J, Petrovic M, González S, Barcelo D, et al. Polar Pollutants Entry into the Water Cycle by Municipal Wastewater: A European Perspective. *Environ Sci Technol*. 2006;40(17):5451-8.
- [386] Terzić S, Senta I, Ahel M, Gros M, Petrović M, Barcelo D, et al. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Sci Total Environ*. 2008;399(1-3):66-77.
- [387] Vieno NM, Tuhkanen T, Kronberg L. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*. 2006;1134(1-2):101-11.
- [388] Togola A, Budzinski H. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2007;388(3):627-35.
- [389] Coetsier CM, Spinelli S, Lin L, Roig B, Touraud E. Discharge of pharmaceutical products (PPs) through a conventional biological sewage treatment plant: MECs vs PECs? *Environ Int*. 2009;35(5):787-92.
- [390] Rabiet M, Togola A, Brissaud F, Seidel J-L, Budzinski H, Elbaz-Poulichet F. Consequences of Treated Water Recycling as Regards Pharmaceuticals and Drugs in Surface and Ground Waters of a Medium-sized Mediterranean Catchment. *Environ Sci Technol*. 2006;40(17):5282-8.
- [391] Paffoni C, Welte B, Gousailles M, Montiel A. Nouvelles molécules mises en cause par les directives européennes : De la station d'épuration à l'usine de traitement d'eau potable. *Eur J Water Qual*. 2006;37(1):21-37.
- [392] Bruchet A, Hochereau C, Picard C, Decottignies V, Rodrigues JM, Janex-Habibi ML. Analysis of drugs and personal care products in French source and drinking waters: the analytical challenge and examples of application. *Water Sci Technol*. 2005;52(8):53-61.
- [393] Feitosa-Felizzola J, Chiron S. Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *J Hydrol*. 2009;364(1-2):50-7.
- [394] Comoretto L, Chiron S. Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Sci Total Environ*. 2005;349(1-3):201-10.
- [395] Zhang Z, Hibberd A, Zhou JL. Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: Comparison between spot and passive sampling. *Anal Chim Acta*. 2008;607(1):37-44.
- [396] Zhang ZL, Zhou JL. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007;1154(1-2):205-13.
- [397] Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007;1161(1-2):132-45.
- [398] Chefetz B, Muallem T, Ben-Ari J. Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. *Chemosphere*. 2008;73(8):1335-43.
- [399] Loos R, Hanke G, Eisenreich SJ. Multi-component analysis of polar water pollutants using sequential solid-phase extraction followed by LC-ESI-MS. *J Environ Mon*. 2003;5(3):384-94.
- [400] Castiglioni S, Bagnati R, Calamari D, Fanelli R, Zuccato E. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J Chromatogr A*. 2005;1092(2):206-15.
- [401] Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R. Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J Hazard Mater*. 2005;122(3):205-9.
- [402] Loos R, Wollgast J, Huber T, Hanke G. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Anal Bioanal Chem*. 2007;387(4):1469-78.

- [403] Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.* 2006;40(17):3297-303.
- [404] Tiehm A, Schmidt N, Stieber M, Sacher F, Wolf L, Hoetzel H. Biodegradation of Pharmaceutical Compounds and their Occurrence in the Jordan Valley. *Water Resour Manag.* 2011;25(4):1195-203.
- [405] Viglino L, Aboufadi K, Mahvelat AD, Prevost M, Sauve S. On-line solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to quantify pharmaceuticals, pesticides and some metabolites in wastewaters, drinking, and surface waters. *J Environ Mon.* 2008;10(4):482-9.
- [406] Lajeunesse A, Gagnon C. Determination of acidic pharmaceutical products and carbamazepine in roughly primary-treated wastewater by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Environ Anal Chem.* 2007;87(8):565-78.
- [407] Metcalfe CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA, Hirsch R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ Toxicol Chem.* 2003;22(12):2872-80.
- [408] Hao C, Lissemore L, Nguyen B, Kleywegt S, Yang P, Solomon K. Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2006;384(2):505-13.
- [409] MacLeod SL, McClure EL, Wong CS. Laboratory calibration and field deployment of the Polar organic chemical integrative sampler for pharmaceuticals and personal care products in wastewater and surface water. *Environ Toxicol Chem.* 2007;26(12):2517-29.
- [410] Scharf S, Gans O, Sattelberger R. Arzneimittelwirkstoffe im Zu- und Ablauf von Kläranlagen.: Umweltbundesamt Wien (ISBN 3-85457-624-2)2002.
- [411] Ahrer W, Scherwenk E, Buchberger W. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2001;910(1):69-78.
- [412] Clara M, Strenn B, Gans O, Martinez E, Kreuzinger N, Kroiss H. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res.* 2005;39(19):4797-807.
- [413] Moldovan Z, Schmutzer G, Tusa F, Calin R, Alder AC. An overview of pharmaceuticals and personal care products contamination along the river Somes watershed, Romania. *J Environ Mon.* 2007;9(9):986-93.
- [414] Moldovan Z. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere.* 2006;64(11):1808-17.
- [415] Lavén M, Alsberg T, Yu Y, Adolfsson-Erici M, Sun H. Serial mixed-mode cation- and anion-exchange solid-phase extraction for separation of basic, neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2009;1216(1):49-62.
- [416] Bueno MJM, Aguera A, Gomez MJ, Hernando MD, Garcia-Reyes JF, Fernandez-Alba AR. Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal Chem.* 2007;79(24):9372-84.
- [417] Pedrouzo M, Reverte S, Borrull F, Pocurull E, Marce RM. Pharmaceutical determination in surface and wastewaters using high-performance liquid chromatography-(electrospray)-mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2007;30(3):297-303.
- [418] Radjenović J, Petrović M, Barceló D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Res.* 2009;43(3):831-41.
- [419] Santos JL, Aparicio I, Alonso E. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environ Int.* 2007;33(4):596-601.
- [420] Matamoros V, Garcia J, Bayona JM. Organic micropollutant removal in a full-scale surface flow constructed wetland fed with secondary effluent. *Water Res.* 2008;42(3):653-60.
- [421] Santos JL, Aparicio I, Alonso E, Calleón M. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Anal Chim Acta.* 2005;550(1-2):116-22.
- [422] Santos JL, Aparicio I, Callejón M, Alonso E. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J Hazard Mater.* 2009;164(2-3):1509-16.
- [423] Rodil R, Quintana JB, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D. Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2009;1216(14):2958-69.
- [424] Gros M, Petrović M, Barceló D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain). *Environ Toxicol Chem.* 2007;26(8):1553-62.
- [425] Choi K, Kim Y, Park J, Park CK, Kim M, Kim HS, et al. Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Sci Total Environ.* 2008;405(1-3):120-8.

- 
- [426] Kim J-W, Ishibashi H, Hirano M, Jang H-S, Kim J-G, Takao Y, et al. Contamination of Pharmaceutical and Personal Care Products in Sewage Treatment Plants and Surface Waters in South Korea and their Removal during Activated Sludge Treatment. *J Environ Chem.* 2010;20(2):127-35.
- [427] Behera SK, Kim HW, Oh J-E, Park H-S. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci Total Environ.* 2011;409(20):4351-60.
- [428] Ryu J, Yoon Y, Oh J. Occurrence of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals in 11 WWTPs in Seoul, Korea. *KSCE J Civ Eng.* 2011;15(1):57-64.
- [429] Chen H-C, Wang P-L, Ding W-H. Using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry to determine pharmaceutical residues in Taiwanese rivers and wastewaters. *Chemosphere.* 2008;72(6):863-9.
- [430] Lin AY-C, Yu T-H, Lateef SK. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. *J Hazard Mater.* 2009;167(1-3):1163-9.
- [431] Benotti MJ, Brownawell BJ. Distributions of pharmaceuticals in an urban estuary during both dry- and wet-weather conditions. *Environ Sci Technol.* 2007;41(16):5795-802.
- [432] Sponberg AL, Witter JD. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Sci Total Environ.* 2008;397(1-3):148-57.
- [433] Conkle JL, White JR, Metcalfe CD. Reduction of pharmaceutically active compounds by a lagoon wetland wastewater treatment system in Southeast Louisiana. *Chemosphere.* 2008;73(11):1741-8.
- [434] Bartelt-Hunt SL, Snow DD, Damon T, Shockley J, Hoagland K. The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environ Pollut.* 2009;157(3):786-91.
- [435] Conley JA, Symes SJ, Kindelberger SA, Richards SA. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. *J Chromatogr A.* 2008;1185(2):206-15.
- [436] Focazio MJ, Kolpin DW, Barnes KK, Furlong ET, Meyer MT, Zaugg SD, et al. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States -- II) Untreated drinking water sources. *Sci Total Environ.* 2008;402(2-3):201-16.
- [437] Conley JM, Symes SJ, Kindelberger SA, Richards SM. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. *J Chromatogr A.* 2008;1185(2):206-15.
- [438] Palmer PM, Wilson LR, O'Keefe P, Sheridan R, King T, Chen CY. Sources of pharmaceutical pollution in the New York City Watershed. *Sci Total Environ.* 2008;394(1):90-102.
- [439] Zhang S, Zhang Q, Darisaw S, Ehie O, Wang G. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere.* 2007;66(6):1057-69.
- [440] Alvarez DA, Stackelberg PE, Petty JD, Huckins JN, Furlong ET, Zaugg SD, et al. Comparison of a novel passive sampler to standard water-column sampling for organic contaminants associated with wastewater effluents entering a New Jersey stream. *Chemosphere.* 2005;61(5):610-22.
- [441] Drewes JE, Heberer T, Rauch T, Reddersen K. Fate of pharmaceuticals during ground water recharge. *Ground Water Monit R.* 2003;23(3):64-72.

## SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde. Der Inhalt der geltenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin vom 01. September 2005 ist mir bekannt.

Berlin, den 24.4.2012

Arnold Bahlmann